

MINIATURIZED CELL ARRAY METHODS AND APPARATUS FOR CELL-BASED SCREENING

Publication number: JP2000512009T

Publication date: 2000-09-12

Inventor:

Applicant:

Classification:





- international: **B01J19/00; C12M1/34; G01N21/64; G01N21/66; G01N33/48; G01N33/50; G01N33/543; G01N33/569; B01J19/00; C12M1/34; G01N21/62; G01N21/64; G01N33/48; G01N33/50; G01N33/543; G01N33/569; (IPC1-7): G01N33/48; C12M1/34; G01N21/64**

- european: **B01J19/00C; B01J19/00R; C12M1/34; G01N21/64P; G01N33/50D2; G01N33/543K2B; G01N33/569H; Y01N6/00**

Application number: JP19970543049T 19970529

Priority number(s): WO1997US09564 19970529; US19960018696P 19960530

Also published as:

 WO9745730 (A1)
 EP0912892 (A1)
 EP0912892 (A0)
 AU734704 (B2)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2000512009T

Abstract of corresponding document: **WO9745730**

The present invention discloses devices and methods of performing high-throughput screening of the physiological response of cells to biologically active compounds and methods of combining high-throughput with high-content spatial information at the cellular and subcellular level as well as temporal information about changes in physiological, biochemical and molecular activities. The present invention allows multiple types of cell interactions to be studied simultaneously by combining multicolor luminescence reading, microfluidic delivery, and environmental control of living cells in non-uniform micro-patterned arrays.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2000-512009
(P2000-512009A)

(43) 公表日 平成12年9月12日 (2000.9.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	M
C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁)

(21) 出願番号 特願平9-543049
(86) (22) 出願日 平成9年5月29日 (1997.5.29)
(85) 翻訳文提出日 平成10年11月30日 (1998.11.30)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 0 9 5 6 4
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 4 5 7 3 0
(87) 国際公開日 平成9年12月4日 (1997.12.4)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 1 8 , 6 9 6
(32) 優先日 平成8年5月30日 (1996.5.30)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(81) 指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,
D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L
U , M C , N L , P T , S E) , A U , C A , J P , M
X

(71) 出願人 ビオディックス
アメリカ合衆国 15238 ペンシルヴェニア州
ピッツバーグ ウィリアム ビット
ウェイ 635
(72) 発明者 テイラー、ディー、ランシング
アメリカ合衆国 15215 ペンシルヴェニア州
ピッツバーグ ノートル ダム プ
レイス 910
(74) 代理人 弁理士 三好 秀和 (外1名)

(54) 【発明の名称】 小型化した細胞配列法および細胞に基づいたスクリーニングを行なうための装置

(57) 【要約】

本発明は、生物学的に活性のある化合物に対する、細胞の生理学的応答を高速処理でスクリーニングする装置および方法、および、細胞レベルおよび細胞内レベルでの高容量の空間的情報や、生理学的、生化学的および分子的な活性の変化に関する経時的な情報と、高速処理とを組み合わせる方法を開示している。本発明は、均一でない微細パターンをもつ配列において、多色発光の読み取り、微量液体輸送輸送、および生細胞の環境制御を組み合わせることによって、多くのタイプの細胞の相互作用を同時に研究することを可能にする。

【特許請求の範囲】

1. a) 細胞と相互作用させるための、微細にパターン化された化学物質の配列をもつ基板、および、

b) 微細にパターン化した化学物質の配列の上に接種された不均一な微細パターンをもつ細胞配列を含む、細胞をスクリーニングするための配列。

2. 細胞が、少なくとも1つの発光レポーター分子を含む、請求項1の細胞をスクリーニングするための配列。

3. 試薬を組み合わせたものを、不均一な微細パターンをもつ細胞配列に輸送するための液体輸送システムをさらに含む、請求項1の細胞をスクリーニングするための配列。

4. a) 微細にパターン化された化学物質の配列を調製すること、

b) 微細にパターン化された化学物質の配列を、不均一に化学的に修飾することによって、微細にパターン化された化学物質の配列を処理して、修飾された微細にパターン化された化学物質の配列を作製すること、および、

c) 修飾された微細な化学物質の配列に細胞を結合させて、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を作製すること

を含む不均一な微細パターンをもつ細胞配列を作製するための方法。

5. a) 細胞が少なくとも1つの発光レポーター分子を含む、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を調製すること、

b) 不均一な微細パターンをもつ細胞配列を、液体輸送システムに接触させて、不均一な微細パターンをもつ細胞配列に液体を輸送すること、

c) 不均一な微細パターンをもつ細胞配列全体の発光画像を低倍率で捕捉して、全部のウェルから発光シグナルを同時に検出すること、

d) 不均一な微細パターンをもつ細胞配列の各ウェルの発光画像を高倍率で捕捉して、細胞の中の発光レポーター分子からの発光シグナルを得ること、

e) 発光シグナルをデジタルデータに変換すること、および、

f) デジタルデータを利用して、細胞の中の発光レポーター分子の分布、環境、または活性を決定することを含む、細胞を解析するための方法。

6. a) 発光読み取り機器、
b) i) 細胞が少なくとも1つの発光レポーター分子を含む、不均一な微細パターンをもつ細胞配列、および、
ii) 不均一な微細パターンをもつ細胞配列と結合し、さ

らに、不均一な微細パターンをもつ細胞配列に液体を輸送するための液体輸送システムを具備しているチャンバーを含む、発光読み取り機器の中に挿入することができるカセット、

- c) 発光読み取り機器からデータを受け取り、このデータをデジタルデータに変換するためのデジタル式検出器、および、
d) デジタル式検出器からデジタルデータを受け取って、処理するためのコンピュータ装置

を組み合わせて含む細胞のスクリーニングシステム。

7. コンピュータ装置が、

- a) 検出装置からコンピュータに、画像をデジタル式に転送させる手段、
b) ユーザーと対話し、また、アッセイ結果を表示するための画面、
c) アッセイ結果を処理する手段、および、
d) データを保存し、保管するためのデジタル式の保存媒体、

を含む請求項6の細胞スクリーニングシステム。

8. 発光読み取り機器が、蛍光顕微鏡の光学装置を含む、請求項6の細胞スクリーニングシステム。

【発明の詳細な説明】**小型化した細胞配列法および****細胞に基づいたスクリーニングを行なうための装置****関連出願**

本出願は、1996年5月30日に提出された米国特許出願第60/018,696号の仮出願、および、1997年2月27日に提出された米国特許出願第08/810983号の出願の一部継続出願であり、これらはともに、全体として、参照して本明細書に組み込まれる。

発明の分野

本発明は、基盤上に、細胞を不均一に微細パターン化して配列したものを、高速処理的、および高生物容量的にスクリーニングするための方法と装置に関するものである。

先行技術の説明

拡大しつつある薬剤発見およびコンビナトリアル化学法領域において、候補物質を作出するためには、高速処理スクリーニングによって、動物や人間に対する、多数の物質の生理学的効果が迅速にスクリーニングできれば非常に有用であろう。動物に対して「部分的に適性を認められた」候補薬剤の効力を試験する前に、まず、動物

モデルで試験する前に、その薬剤の生物学的活性と潜在的な毒性を生細胞でスクリーニングすることができよう。そして、これらの細胞スクリーニングの結果に基づいて、候補薬剤に対する生理学的応答を予測することができよう。

従来、「鉛化合物」は、時間もかかり、費用もかかる広範な動物実験に、すぐに移行した。さらに、動物での広範な薬剤試験は、米国や欧州では、次第に、文化的に認められにくくなっている。動物実験を行なう前に、生細胞との相互作用による、薬剤候補のスクリーニングを行なうと、動物実験に移行する前に、いくつかの薬剤候補を消去させることによって、その後の薬剤スクリーニング過程で必要となる動物の数を減少させることができる。しかし、現行の方法を用いた、薬剤-細胞相互作用の操作と解析では、一定の時間内に解析できる細胞と化合物

の数が少なく、化合物の輸送に必要な方法が煩雑で、また、試験に大量の化合物が必要となるため、高速処理のスクリーニングと高生物容量のスクリーニングの両方を考慮することができない。

コンビナトリアル化学法として知られている技術によって、核酸とポリヌクレオチドの高速処理スクリーニングが行われている。典型的なコンビナトリアル化学法では、小さなガラス板上の一定の位置（スポット）に、10から14塩基対のDNA配列を何万という数まで付着させる（米国特許第5,556,752号、参照して本明細書に組み込ま

れる）。こうして、所定のガラス板上に、DNAスポットの配列ができる。あるスポットの配列中の位置が、後で、各DNAスポットを参照するためのアドレスを提供する。次に、このDNA配列を、蛍光分子で標識した相補的DNA配列とハイブリダイズさせる。蛍光分子が、ハイブリダイズする核酸配列に付着すると、配列上の各アドレスから出るシグナルとして検出される。塩基配列の配列を付着させたガラス板は、「登録商標ジーンチップ（GENECHIP）」という商品名で、アッフィメトリックス社（Affymetrix）から購入することができる。これらの装置を用いることによって、薬剤発見努力とヒトゲノム配列決定プロジェクトにおいて、DNA配列の高速処理スクリーニング法が提供されてきた。同様に、さまざまなアミノ酸長の蛋白質の配列が、ガラス板上の配列として付着されている（米国特許第5,143,854号、参照して本明細書に組み込まれる）

ガラス板に結合した核酸またはアミノ酸の配列によって提供される情報は、その基底にある「言語」によって制約を受ける。例えば、DNA配列は、4種類の核酸という言語のみからなり、蛋白質は、20種類のアミノ酸という言語からなる。これに対して、生物学的要素を複合的に組織化して含んでいる生細胞は、例えば、DNA、RNA、細胞表面蛋白質、細胞内蛋白質など、非常に多様な物質との同時発生的な多数の相互作用をもつ、広範な「言語」をもつ。薬剤作用の典型的な標的は、身体の細胞とともに、および、その細胞の中にあるため、感度のよい検出

試薬と組み合わせれば、細胞そのものが、薬剤発見における有用なスクリーニン

グ用の道具となる。したがって、細胞レベル、および細胞以下のレベルでの高容量の空間的情報や、生理学的、生化学的、および分子活性の変化に関する時間的な情報を提供するための高速処理的な高容量スクリーニング装置があれば、もっとも有用であろう（米国特許出願第08/810983号）。

細胞の微細配列

別の応用目的で、均一に微細に配置された細胞配列を作製するための方法、例えば、光化学作用によるフォトレジストリソグラフィーが説明されている（MrksichとWhitesides）、Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 25:55-78, 1996）。このフォトレジスト法によると、ガラス板は、フォトレジストで均一にコートされ、望ましい「配列」ないしパターンを画定するために、フォトレジストコートの上にフォトマスクが置かれる。感光させると、マスクされていない領域のフォトレジストが除去される。フォトレジストリソグラフィーによって画定された表面全体は、感光させるガラス部分とフォトレジストで覆われた部分の両方に結合する有機シランなどの疎水性物質で均一にコートされている。そして、このフォトレジストをガラス表面から剥がして、感光させたガラスのスポット配列を露出させる。そして、アミノ基などの親水基ないし化学反応基を末端にもつ有機シランで、ガ

ラス板を洗浄する。疎水的な有機シランは、露出されたガラススポットに結合し、その結果、ガラス板は、疎水的な表面を横切って、親水的な、または反応性のあるスポット配列（もとは、フォトレジストであった部分にある）をもつようになる。疎水基のスポットの配列は、ニューロン起源の細胞を含む一定の細胞が非特異的、かつ非共有的に結合するための基体を提供する（Kleinfeldら、J. Neurosci. 8:4098-4120, 1988）。シリコン薄片の表面上で、反応性のイオンエッチングを同じように用いて、2つの異なったタイプの素材でパターン化された表面が作製されている（Craigheadら、Appl. Phys. Lett. 37:653, 1980; Craigheadら、J. Vac. Sci. Technol. 20:316, 1982; Suhら、Proc. SPIE382:199, 1983）。

特異的であるが、非共有的な相互作用に基づく別の方法では、フォトレジストスタンプを用いて、蛋白質吸着性アルカンチオールでコートされた金表面を作製

する (Singhviら、Science 264:696-698, 1994)。次に、蛋白質吸着を防ぐ、ポリエチレン末端をもつアルカンチオールで、裸出した金表面をコートする。表面全体を細胞外基質の中に見られる細胞結合蛋白質であるラミニンに裸出させると、生きた肝細胞は、ラミニンでコートされた部分に均一に付着し、その上で増殖する (Singhviら、1994)。強力であるが、非共有的な金属キレート化を含む精巧な作用を用いて、特異的な蛋白質のパターンによって、金の表面をコートしてきた (Sigalら、Anal. Che

m. 68:490-497, 1996)。この場合、金の表面は、ニトリロ酢酸の末端をもつアルカンチオールで配列されている。金が剥き出しになっている領域をトリ (エチレングリコール) でコートして、蛋白質の吸着を抑制する。Ni²⁺を付加すると、5個のヒスチジンでタグした蛋白質の特異的な吸着は、動力学的に安定することが分かっている。

蛋白質など、化学的な架橋に特異的な分子によって、パターン化された基体上の反応部位への、より特異的で均一な細胞結合を行なうことができる (AplinとHughes, Analyt. Biochem. 113:144-148, 1981)。基体をパターン化する別の細工によって、反应用のスポット配列が光学的に作出される。ガラスをコートするために、ガラスに化学吸着する有機シランで、ガラス板を洗浄する。有機シランコートに、配列のパターンを画定する光学的なマスクを通して強い紫外光を照射する。この照射によって、Si-C結合が切断され、反応性のSi遊離基が形成される。水との反応によって、Si遊離基は、極性のシラノール基を形成する。参照してここに組み込まれる米国特許第5,324,591号において開示されているように、極性のシラノール基は配列上でスポットを構成し、別の反応分子をスポットに結合できるように、さらに修飾される。例えば、遊離アミノ部位のような、生物学的な官能基を含むシランは、シラノール基と反応することができる。そして、この遊離アミノ基を、蛋白質や核酸、炭水化物、脂質などの生体分子が共有結合的に付着するための部位と

して用いることができる。細胞表面と相互作用することが知られているレクチン

が、反応性のアミノ基によって、ガラス基体に、パターン化されない共有結合的な付着を行なうことが明らかにされている (AplinとHughes, 1981)。支持体上に均一な細胞の配列を形成する光学的な方法は、フォトレジスト法よりも、必要とされるステップが少なく、迅速である (つまり、2つのステップしかない) が、高価な光源からの高強度の紫外光を使用する必要がある。

生化学的に特異的な分子が、微細にパターン化された化学物質の配列に均一に結合しているため、これらのすべての方法で作出される細胞配列は均一のものである。フォトレジスト法では、細胞は、疎水的なスポットの配列に結合し、および/または、スポットに付着した特異的な分子で、細胞にも結合する分子に結合する。このように、細胞は、同じ実施形態で、配列中の全てのスポットに結合する。光学的方法においては、細胞は、接着によって、遊離アミノ基のスポットの配列に結合する。遊離アミノ基のスポットの間には、ほとんど、または全く差異がない。ここでも、細胞は、全てのスポットに同一の実施形態で接着するため、これらの細胞配列によって、単一のタイプの細胞の相互作用を調べることができる。なぜなら、配列上の各スポットは、本質的に、互いに同一だからである。このような細胞配列は、単一のサンプル中の特異的な種類の細胞、または特異的な種類の細胞

の相互作用を研究するための道具として利用するとき融通がきかない。このため、同時に解析することができる細胞の種類や、特異的な細胞相互作用を増加させるために、均一でない微細パターン化細胞配列に対する需要と、高速処理で、高生物学的容量の細胞スクリーニングを行なうために、均一でない微細パターン化細胞配列を作製する方法に対する需要が存在している。

微量液体輸送

固形基体に付着している細胞配列への溶液の効果的な輸送は、微量液体輸送システムによって促進される。インク輸送のため (米国特許第5,233,369号; 米国特許第5,486,855号; 米国特許第5,502,467号; すべてが、参照してここに組み込まれる)、生体サンプルの吸引のため (米国特許第4,982,739号、参照してここに組み込まれる)、試薬保存と輸送のため (米国特許第5,031,797号、参照して

ここに組み込まれる)、および、臨床診断ならびに化学合成のために仕切られたマイクロエレクトロニクス的な微量液体輸送装置を配列するため(米国特許第5,585,069号、参照してここに組み込まれる)の少量の液体サンプルの正確な取り扱いに関する方法と装置が説明されている。さらに、表面に沿って、少量の液体サンプルを流すために用いることのできる、固形基体中でのマイクロチャンネルの形成法と装置について説明されている(米国特許第5,571,410号;米国特許第5,500,071号;米

国特許第4,344,816号;すべてが、参照してここに組み込まれる)。しかし、閉鎖された光学用チャンバーの中の固形基体上で、不均一な配列に微細パターン化された生細胞に溶液を輸送するための既知の方法はない。

細胞生理学の光学的な読み取り

何千もの化合物について高速処理スクリーニングを行なうには、多くの化合物と、アッセイ成分となる試薬とを、並行して取り扱い、処理することが必要となる。標準的な高速処理スクリーニング法では、指示剤となる化合物と一緒に、化合物と生物学的試薬との均一な混合液を、96穴または384穴の標準的な微量滴定用プレートのウェルに入れて用いる。(Kahlら、J. Biomol. Scr. 2:33-40, 1997)。蛍光発光、光学密度、または放射活性など、各ウェルから測定されるシグナルは、ウェルの中の全ての物質からのシグナルをまとめたものであり、ウェルの中の全ての分子の集団全体の平均が得られる。このタイプのアッセイ法は、一般的に、均一アッセイ法と呼ばれている。

ワシントン州シアトル、5番街130 (130 Fifth Avenue, Seattle, WA. 98109)にあるサイエンス・アプリケーションズ・インターナショナル・コーポレーション社 (Science Applications International Corporation) (SAIC) は、画像化プレート読取器について説明している(米国特許第5,581,487号、参照してここに組み込まれる)。

このシステムでは、96穴プレートの全領域を画像化するために、CCD検出器(電荷結合光学検出器)が用いられる。この画像を解析して、均一アッセイ法に関

して、ウェル毎の全蛍光量を計算する。

モレキュラー・デバイス社 (Molecular Devices Inc.) は、細胞の単層を画像化するとき、バックグラウンドを抑えるために、低角度のレーザースキャン照明とマスクとを用いて、96穴プレートのウェルの底の約200ミクロン以内の蛍光を選択的に励起するシステム (商標登録FLIPRTM) について説明している。(シュレーダーとニーグル (Schroeder and Neagle)、J. Biomol. Scr. 1:75-801996)。このシステムでは、プレートの底の全領域を画像化するためにCCDカメラが用いられている。このシステムでは、ウェルの底にある細胞単層から発生するシグナルが測定されるが、測定されたシグナルは、細胞集団の平均的な応答であるため、このシグナルは、ウェルの全領域にわたって平均され、依然、均一な測定法と考えられる。この画像を解析して、細胞に基づく均一アッセイ法に関して、ウェル毎の全蛍光量を計算する。

プロフィットら (Profitte et.al.) (Cytometry 24:204-213,1996) はフルオレセインジアセテート (fluorescein diacetate) (FDA) 蛍光標識により調製した細胞をin situにおいて相対的な細胞数を計量するための半自動蛍光デジタルイメージングシステムについて記述している。このシステムは組織培養プレートフォーマット、

特に96穴の微量滴定用プレートの組合せを利用している。さらにシステムはモータ駆動のステージを有する蛍光倒立顕微鏡と、ビデオカメラと、イメージインテンシファイアーと、PC-Visionデジタイザーを有するマイクロコンピュータとから構成される。ターボパスカル (Turbo Pascal) によるソフトウェアはステージを制御してプレートを走査しウェルごとに多数の画像を取得する。ソフトウェアはウェル毎に全蛍光強度を計算して日々の校正 (calibration) を提供し、さらに組織培養プレートフォーマットの組合せを配列する。過剰な蛍光試薬を除去することなくバックグラウンドの蛍光を低減するために、デジタルイメージの閾値処理および生細胞に取り込まれたときにのみ蛍光を発する試薬を使用した。

顕微鏡下での蛍光細胞を画像化し細胞の空間分布や細胞内での時間的な変化に

関する情報を抽出するための種々の方法が開発されている。最近の論文においてもこれらの方法や応用が記述されている (Tailor et.al., Am.Scientist 80:322-335, 1992)。細胞内の蛍光レポーター分子の分布、量、生化学的環境の高空間分解能、高時間分解能な画像計測のために、少数試料のプレパレーションのためのこれらの手法が設計され、最適化されてきた。

染料および蛍光試薬によって細胞を処理して、細胞を画像化すること (Wangら、(細胞生物学の方法) In Methods in Cell Biology, New York, Alan R. Liss, 29:1

-12, 1989)、および、レポーター分子として修飾緑色蛍光蛋白質 (GFP) などの蛍光蛋白質を産生するために、細胞の遺伝子工学を行なうことは、有用な検出法である。クラゲのアエコレア・ビクトリア (Aequorea victoria) の緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、395 nmのところで最大に励起し、510 nmで最大に発光し、また、外在的な因子を必要としない。遺伝子発現と蛋白質の局在を研究するために、GFPを使用することが、Chalfieら、Science 263:802-805, 1994において検討されている。野生型GFPのいくつかの特性が、Moriseら (Biochemistry, 13:2656-2662, 1974)、およびWardら (Photochem. Photobiol. 31:611-615, 1980) によって開示されている。Rizzutoら (Nature 358:325-327, 1992) による論文では、細胞の中の細胞内小器官を可視化するための手段として野生型GFPを使用することが検討されている。KaetherとGerdes (FEBS Letters 369:267-271, 1995) は、野生型GFPを用いて、分泌経路に沿った蛋白質の移行を可視化することを報告している。植物細胞の中でのGFPの発現が、HuとChengによって検討されている (FEBS Letters 369:331-334, 1995) 一方で、ショウジョウバエの胚におけるGFP発現が、Davisら (Dev. Biology 170:726-729, 1995) によって説明されている。参照してここに組み込まれる米国特許第5,491,084号は、目的とする別の蛋白質に融合したレポーター分子として、細胞の中で、アエコレア・ビクトリア (Aequorea victoria) に由来するGFPの発現させること

を開示している。参照してここに組み込まれるPCT/DK96/00052は、プロテインキ

ナーゼ活性化部位をもつGFP構築物を利用することによって、細胞内の作用過程に影響する、生物学的に活性のある物質を検出する方法に関する。多くの参考文献が、生物学的システムにおけるGFP蛋白質に関係する。例えば、参照してここに組み込まれるPCT/US95/10165は、GFP様蛋白質の発現を利用して、目的の細胞を単離するためのシステムについて説明している。参照してここに組み込まれるPCT/GB96/00481は、植物におけるGFPの発現について説明している。参照してここに組み込まれるPCT/US95/101425は、突然変異の発生を検出するために形質転換された生物で発現される、修飾されたGFP蛋白質について説明している。GFPの変異体が調製されて、いくつかの生物学的システムで使用されている。(Hasselhoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2122-2127,1997; Brejcら、Proc.Natl.Acad.Sci.94:2306-2311,1997; Chengら、Nature Biotech. 14:606-609, 1996; HeimとTsien、Curr. Biol. 6:178-192, 1996; Ehrigら、FEBS Letters 367:163-166, 1995)。細胞表面レセプターを発現し、細胞表面レセプターの活性に応答する転写調節因子を含むレポーター遺伝子構築物を含む組換え細胞を用いて、細胞外シグナルの細胞内への伝達を検出し、評価するためのアッセイ法と組成物を説明している方法が、米国特許第5,436,128号と米国特許第5,401,629号で開示されており、これらは両方とも、参照してここ

に組み込まれる。

バイオディックス社 (BioDx Inc.) によって開発された、商標登録アレイスキャン (ArrayScanTM) システム (米国特許出願S/N 08/810983) は、特異的な生物学的活性について、非常に多数の化合物をスクリーニングするために、発光標識されたレポーター分子の細胞における分布、環境、または活性を判定するための光学的なシステムである。商標登録アレイスキャン (ArrayScanTM) システムは、均一な位置配列に置かれた、発光するレポーター分子を含む細胞を提供することと、蛍光顕微鏡によって各位置にある多数の細胞をスキャンして、光学的な情報をデジタル式のデータに変換し、細胞の中の、発光性標識されたレポーター分子の分布、環境、または活性を判定するために、このデジタル式のデータを利用することを含む。現在用いられている均一な配列位置は、産業上標準的な96穴

または384穴の微量滴定用プレートである。商標登録アレイスキャン (ArrayScanTM) システムには、データを処理し、表示し、保存するための装置、およびコンピュータ化された方法が含まれ、これによって、大きな微量滴定用プレートフォーマットにおける、細胞に基づく高容量スクリーニング法が提供されて、薬剤発見の機会が増大する。

本発明は、不均一な微細パターンをもつ配列における、多色発光読み取り、微量液体輸送、および生細胞の環境制御とを組み合わせる方法および装置を備えている。典

型的には、標準的な微量滴定用プレートフォーマットである96穴の微量滴定用プレートは、9mm間隔で、直径6mmのウェルをもつ。384穴プレートのような、より高密度のプレートでは、ウェルの大きさも、ウェルの間隔も小さくなり（例えば、3mmと4.5mmに）、同じフォーマットで、より多くのウェルを包含する。本発明は、典型的には、ウェルの直径が、ほんの0.2-1.0mmの大きさに等しい領域を必要とする、高速処理で、かつ高容量の細胞に基づくアッセイ法を提供する。ウェルの大きさと配列のサイズを縮小することは、高容量スクリーニングをスキャンするスピードと効率を向上させるだけでなく、より低い空間分解能で全領域を読み取ることによって、同一の細胞配列上で、高速処理スクリーニングを行なうことが可能になる。このため、高速処理の一次スクリーニングを、同じプラットフォーム上で、高容量の二次スクリーニングと直接に結合させることができる。結果的に、高容量スクリーニングが、高速処理スクリーニングになる。また、各スクリーニングプロトコルで用いられる高価な試薬と候補薬剤の容量を劇的に節約することができる。さらに、「ウェル」への細胞の輸送は、特異的な結合に基づいているため、高精度の小水滴を特定の位置に輸送する必要がない。本明細書で用いられるとき、「ウェル」という語は、どのような深さであるかには関係なく、ただ、基底上の細胞結合部位の位置を意味する。

このように、本発明は、生物学的に活性のある化合物に対する、細胞の生理学的な応答の、高速処理かつ高容量のスクリーニングを行なうための独自の方法と

装置で、不均一な微細パターンをもつ配列における、多色発光読み取り、微量液体輸送、および生細胞の環境制御とを組み合わせることによって、多数のタイプの細胞の相互作用を同時に研究することが可能になる方法と装置を提供する。

発明の概要

本発明は、生物学的に活性のある化合物に対する、細胞の生理学的な応答の、高速処理かつ高容量のスクリーニングを行なうための独自の方法と装置を提供する。本発明は、不均一な微細パターンをもつ配列における、多色発光読み取り、微量液体輸送、および生細胞の環境制御とを組み合わせることによって、多数のタイプの細胞の相互作用を同時に研究することを可能にする方法と装置を提供する。

一つの実施形態において、本発明には、細胞の不均一な微細パターンをもつ配列と、それを作出するための方法が包含される。この配列は、別々の化合物を組み合わせたもので処理することができる同一の細胞型、または、一種類以上の化合物で処理することができる細胞型を組み合わせたものを含むことができる。組み合わせたものという語は、ウェル、または一群のウェルをさまざまに

処理することを意味する。本発明のさらなる局面は、試薬を組み合わせたものを、細胞を微細パターン化した配列に輸送するための液体輸送システムと組み合わせて、その細胞が、少なくとも一つの発光レポーター分子を含む、本発明の不均一な微細パターンをもつ細胞配列を用いて、細胞を解析するための方法、および、発光するレポーター分子から出る発光シグナルを検出し、記録し、解析するための手段を含む。本発明の別の局面において、不均一な微細パターンをもつ細胞配列中の発光レポーター分子から出る発光シグナルを検出するための発光読み取り機器、発光読み取り機器からのデータを受け取るためのデジタル検出器、および、光検出器からのデジタルデータを受け取って処理するためのコンピュータ装置を含む、細胞のスクリーニングシステムが開示されている。

図面の簡単な説明

本発明と、そのいくつかの局面は、次の図との関連において、よりよく理解できるであろう。すなわち、図1Aは、小さな基体の微細にパターン化された化学

物質の配列の上面から見た図である。

図1Bは、大きな基体の微細にパターン化された化学物質の配列の上面から見た図である。

図2は、基体の上に、微細にパターン化された化学物質の配列を作製する方法を図解したものである。

図3Aは、微細にパターン化された化学物質の配列に付

着し、2種類の蛍光プローブで標識した、表面をパターン化したチップ上での線維芽細胞の増殖を示す写真である。

図3Bは、微細にパターン化された化学物質の配列に付着し、2種類の蛍光プローブで標識した、スポットしたパターンにおける線維芽細胞の増殖を示す写真である。

図4は、不均一な微細パターンをもつ細胞配列の上面と、チャンバーの底面とを組み合わせたカセットの概略図である。

図5は、不均一な微細パターンをもつ細胞配列中の「ウェル」に宛てて配送するためのナノ単位で組み立てられた微量液体チャンネルをもつチャンバーの概略図である。

図6は、チャンネルがないチャンバーの概略図である。

図7Aは、基体の上に食刻した微量液体チャンネルをもつチャンバーを上から見た概略図である。

図7Bは、基体の上に食刻した微量液体チャンネルをもつチャンバーを側面から見た概略図である。

図8Aは、微量液体チャンネルとウェルが、液体輸送チャンバーの上にスタンプされた材料となる基質が浮き上がるようにして形成されているチャンバーを上から見た概略図である。図8Bは、微量液体チャンネルとウェルが、液体輸送チャンバーの上にスタンプされた材料となる基質が浮き上がるようにして形成されているチャンバーを横から見た概略図である。

図9は、各ウェルが、チャンバーの片側から出ているチャンネルによって配送されるチャンバーの概略図である。

図10は、各ウェルが、チャンバーの両側から出ているチャンネルによって配送されるチャンバーの概略図である。

図11は、微量液体スイッチが、光、熱、またはその他の機械的な手段によって制御されるチャンバーの概略図である。

図12は、蛍光顕微鏡を読み取り器として用い、小さなロボットをカセットを操作するために用いている、改変された集積回路の監視装置である発光読み取り機器の概略図である。

図13は、発光読み取り機器の光学的システムの一つの実施形態の概略図である。

図14Aは、細胞スクリーニング法の全体像を示すフローチャートである。

図14Bは、マクロ（高速処理モード）処理のフローチャートである。

図14Cは、ミクロ（高容量モード）処理のフローチャートである。

図15は、集約的な細胞スクリーニングシステムの概略図である。

図16は、発光読み取り機器のユーザーインターフェイスの写真である。

図17Aは、修飾されていない基体に非特異的に付着したリンパ細胞を示す写真である。

図17Bは、IgMでコートした基体に非特異的に付着した

リンパ細胞を示す写真である。

図17Cは、全抗血清でコートした基体に特異的に結合しているリンパ細胞を示す写真である。

図18Aは、「ヒット」と同定している高速処理モードの発光読み取り機器からの写真による画像である。

図18Bは、高容量の生物学的情報であると同定している高容量モードを示す一連の写真による画像である。

図19は、高容量モードから集められた細胞データの表示画面を示す写真による画像である。

好ましい実施形態の詳細な説明

一つの局面において、本発明は、基板上に、細胞の不均一な微細パターンをも

つ配列を作製する方法を教示している。本明細書で定義されているように、不均一な微細パターンをもつ細胞配列とは、支持体の表面に単一の均一なコートの中に分布するのではなく、支持体上の各「ウェル」、または一群のウェルが、その細胞結合選択性においてユニークになるよう、不均一な実施形態で分布している、基板上の細胞の配列を意味する。

不均一な微細パターンをもつ細胞配列を作製する方法は、微細にパターン化された化学物質の配列を調製すること、微細にパターン化された化学物質の配列を不均一に修飾すること、および、不均一に修飾された基板上の微細な化学物質の配列に細胞を結合させることを含む。

好ましい実施形態において、微細にパターン化された

化学物質の配列は、規則的な間隔で親水的なスポット、または「ウェル」8を散在させている疎水的な表面を作出するように処理されている基板4を含む（図1A-1B）。この基板は、従来の光学顕微鏡のカバーガラスなどのように、ガラス、プラスチック、またはシリコンの薄片でもよいが、それ以外の適当な材料で作製して、基板を提供してもよい。前述されたように、「ウェル」という語は、基板上の特異的なスポットを言うために用いられており、特定の深さを必要とするものではない。基板4の表面は、好ましくは、たて約2cmと横3cmであるが、これよりも大きくても小さくてもよい。好ましい実施形態において、微細にパターン化された化学物質の配列のウェル8は、非特異的に細胞に結合することができるか、または、細胞に特異的に結合する分子に結合するように、さらに化学的に修飾することができる、アミノヒドロキシル基、スルフヒドリル基、またはカルボキシル基などの反応性の官能基で、これらに限定されない官能基を含む。

修飾された不均一な微細にパターン化された化学物質の配列は、微細にパターン化された化学物質の配列の中のウェルを特異的に化学修飾して作出される。不均一な微細にパターン化された化学物質の配列の中の修飾されたウェルの配列は、ウェルの中で細胞が付着し、増殖することを可能にする、さまざまに異なった細胞結合分子を含んでいるかもしれない。基板上のウェルの回りの疎水的部位は、細胞の付着と増殖を支持しない。

好ましい実施形態において、不均一な微細パターンをもつ細胞配列は、化学吸着によって、アミノ基のような反応性官能基をもつ物質の層で、ガラスの薄片をコートして作製される。好ましい実施形態において、3-アミノプロピルトリメトキシシラン (APTS)、またはN-(2-アミノエチル-3-アミノプロピル) トリメトキシシラン (EDA) などのアミノシランが用いられるが、この他の反应用物質を用いることもできる。この最初のステップの後、この反应用官能基が存在するために、コートされたガラス薄片の表面全体は親水性になっている。

第二に、光によって切断されうる、または化学的に除去されうるアミノ保護基をもつ物質を含む水滴を、アミノシランでコートしたガラス薄片の上の、分離された位置にある微細にパターンの中に置いて、微細パターンの反応を行なう。一つの実施形態において、このパターンは、方形ないし四角形の配列を含むが、どのような適当な分離パターンを用いてもよい（三角形や円形などがあるが、これらに限定はされない）。一つの実施形態において、水滴の容量は、1ナノリットル (n l) から1000 n l の範囲内である。好ましい実施形態において、水滴の容量は、250-500 n l の範囲内である。適当な光化学的に除去できるアミノ保護基には、4-ブロモメチル-3-ニトロベンゼン、1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-エチル (DMNPE)、およびブチルオキシカルボニルが含まれるが、これらに限定はされない。一つの実施形態にお

いて、パターン化反応は、1マイクロモル (μ M) と1000 μ Mの間の試薬濃度を用いて、37°Cまでの大気温の範囲内の温度で、1分から100分間行なわれる。好ましい実施形態において、この反応は、500 μ Mの試薬濃度を用いて、37°Cで60分間行なわれる。

水滴は、従来からあるインクジェット技術によって、アミノシランでコートされたガラス薄片の上に置いてよい。（両方とも、参照してここに組み込まれる、米国特許第5,233,369号；米国特許第5,486,855号）。あるいは、本明細書において、1 n l から1000 n l の間にある液体を移動させることのできる先細になったロッドとして定義されている、ピンの配列をアミノ保護物質を入れた容器の中に漬けて、その先端に保護物質の水滴を作出する。そして、このピンをガラス薄

片に接触させて、水滴をその上に移動させる。別の実施形態において、米国特許第5,567,294号と米国特許第5,527,673号（両方とも、参照してここに組み込まれる）で説明されているように、アミノ保護物質を含んだ、ガラスかプラスチックで作られた毛細管の配列を、ガラス薄片に接触させて、その表面に水滴を移動させる。このように、ガラス薄片は、疎水的な表面上に保護されたアミノ基を含むスポット、またはウェルの配列で微細にパターン化される（図2A-B）。

第三に、保護されていないアミノ基と反応する疎水性物質で、ガラス薄片を洗う。疎水性物質は、脂肪酸やアルキルヨウ化物であってもよく、または、その他の適当

な構造物でもよい。このようにガラスを誘導体化するための一定の条件が、PrimeとWhitesides, *Science* 252:1164-1167, 1991, Lopezら、*J. Am. Chem. Soc.* 115:5877-5878, 1993, および, MrksichとWhitesides, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25:55-78, 1996に記載されている。脂肪酸、またはアルキルヨウ化物は、保護されていないアミノ基と反応し、それに共有結合的に付着し、アミノ基は、脂肪酸基、またはアルキルヨウ化物基によって疎水性になる。この結果でできる微細にパターン化された化学的配列9は、疎水的なバックグラウンドに保護されたアミノ基を含んだ、ウェル配列8をもつガラス薄片4を含む（図2C）。

第四に、上記の方法によって作出された微細にパターン化された化学物質の配列の中のアミノ基の保護基を不均一に外すことによって、修飾された不均一な微細にパターン化された化学物質の配列が作出される。一つの実施形態において、ウェルに、特異的な分子を化学的にクロスリンクさせることで、化学的な特異性を付加することができる。ウェルの中で、遊離のアミノ基と反応して、特異的な分子にクロスリンクするエチレングリコール(スクシンイミジルスクシネート)など、ホモ、またはヘテロの二価性架橋試薬が、数多く、よく知られている。遊離のアミノ基を、別の生体分子にクロスリンクさせるための試薬と条件は、以下の参照文献によって例示されているように、当技術分野において周知である。Grabarekと

Gergely、Analyt. Biochem. 185:131-135, 1990;McKenzieら、J. Prot. Chem. 7:581-592, 1988;Brinkley, Bioconjugate Chem. 3:12-13, 1992;Fritschら、Bioconjugate Chem. 7:180-186, 1996;および、AplinとHughes、1981。

好ましい実施形態において、修飾された微細にパターン化された化学物質の配列は、コンビナトリアル方式で作出される。その結果できるウェルは不均一である（すなわち、各ウェル、またはウェルの一群は、その細胞結合選択性がユニークなものとなろう）。コンビナトリアルという語は、ウェルが多様に処理されることを意味している。

一つの実施形態において、ステップ3の微細にパターン化された化学物質の配列の保護されたアミノ基の保護を外して、化学的な架橋試薬をもつ特異的な分子を、望ましいパターンに置く。特異的な架橋剤は、アミノ基に結合することができ、さらに細胞結合基をもつ。このステップにおいて、細胞結合基のタイプは、ウェルによって、または、ウェルのグループによって多様で、不均一な配列の設計を創出することができる。

別の実施形態において、ステップ3の微細にパターン化された化学物質の配列のアミノ基を、不均一に脱保護する。光によって活性化できる架橋剤を、脱保護されたアミノ基と反応させる。望ましいパターンをもった光学的なマスクを、ウェルの表面に置き、露出されたウェルを

光源照射する。光を受けるウェルの位置と数は、光学的なマスクの微細なパターンによって調節される。適当な光活性化架橋剤には、アリルニトレン、フッ素化したアリルアザイド、ベンゾフェノン、およびジアゾピルビン酸が含まれる。光学的なマスキングとクロスリンキングを行なうための試薬と条件については、PrimeとWhitesides,1991;Sighviら、1994、Sigalら、1996、およびMrksichとWhitesides, 1996で検討されている。光によって活性化できる架橋剤は、ウェル上のアミノ基に化学的に結合し、また、光を当てられると、抗体などの細胞結合分子に共有結合的に結合するという点で二価的である。光学的に活性化されるクロスリンキングを行なうための試薬と条件については、Theveninら、Eur. J. Biochem. 206:471-477, 1992、およびGoldmacherら、Bioconjugate Chem. 3:104-107,

1992で検討されている。

光によって活性化できる架橋剤を用いるときには、ウェルに結合すべき細胞結合分子でガラス板を覆う。一つの実施形態において、細胞表面抗原反応性抗体、細胞外基質蛋白質（例えば、フィブロネクチンやコラーゲン）、または荷電ポリマー（例えば、ポリ-L-リジン、またはポリ-L-アルギニン）などの細胞結合分子を、約0.1mMから約1mMの範囲内の濃度で用いる。細胞結合分子がウェルを覆っているが、ガラス板は、ガラス板の素材にとって重要な角度寄りも低い角度で、ガラス板の下面から光の照射を受け、光の全内部反射をもたらす。（全内部反

射蛍光顕微鏡に関する考察については、Thompsonら、1993を参照のこと）。一つの実施形態において、照射は、300ナノメートル（nm）から1000 nmの間の波長の光で、室温と37℃の間で、0.1秒から10秒間行なわれる。好ましい実施形態において、300 nmと400 nmの間の波長の光を用いて、室温で1秒間、照射を行なう。光学的クロスリンキングは、光によって活性化されるクロスリンキングを、ウェルを覆っている溶液の中の短い距離に制限するが、これは、Baileyら、Nature 366:44-48, 1993;Farkasら、Ann. Rev. Physiol. 55:785-817, 1993;Taylorら、Soc. Opt. Instr. Eng. 2678:15-27, 1996;Thompsonら、Mason, W.T.（編）,生物学的活性を検出するための蛍光および発光プローブ（Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity）, サンディエゴ：アカデミックプレス（Academic Press）pp. 405-419, 1993で説明されている。

光によって活性化される架橋剤は、架橋剤が照射されたウェルの中だけで、抗体や基質蛋白質などの細胞結合分子と結合する。例えば、ウェルの配列の一行だけを照射して、架橋剤に結合した細胞結合分子をもつウェルを一行作出することができる。非結合の細胞結合分子を除去するために、配列を洗浄した後、続いて、二列目を照射し、その他の列を光学的にマスクしている間に、第二の細胞結合分子でガラス薄片を覆うことによって、第二列目のウェルに、第二の細胞結合分子を結合させること

ができる。PBS、またはその他の適当な緩衝液で、配列を洗浄することによって

、非結合の細胞結合分子を除去する。この方式では、特定の細胞結合分子が存在する中で連続的にマスキングすることによって、複数列のウェル、またはウェルのグループを連続的に照明することができる。あるいは、ピンポイント露光と光学的マスキングを用いて、各ウェルを一つずつ照射することができる。この方法では、配列の列毎、または各ウェル毎に、異なった細胞結合分子を結合させて、望ましいパターンの不均一な細胞の微細配列が作出される。

修飾された微細にパターン化された化学物質の配列を作製するための、さらなる実施形態において、まず、ウェルのアミノ基が、光によって切断される保護基によって、均一に保護されている、微細にパターン化された化学物質の配列を作製する。脱保護すべきウェル以外の全てのウェルを覆うために、さまざまなパターンをもつ光学的なマスクを用いることによって、行や列、および/または各ウェル毎に、連続的に、光により脱保護し、遊離のアミノ基を露出させる。露出されたウェル（すなわち、マスクに覆われていないウェル）を照明すると、保護基が除去される。この配列を、脱保護されたアミノ基に化学的に結合し、ウェルを活性化する二価性の架橋剤で覆う。アミノ基を光によって脱保護するための条件は、Pillai, Padwa, A. (編) 有機光化学(Organic Photochemistry), New York 9:255-323, 1987より、Tenら、Markromo

1. Chem.190:69-82, 1989、Pillai, Synthesis 1980:1-26, 1980, SelfとThompson Nature Medicine 2:817-820, 1996およびSenterら、Photochem. Photobiol.42:231-237, 1985において考察されている。次に、細胞結合分子を、修飾された化学物質の配列の上に流し入れると、それらは架橋剤の残りの部分と反応する。そして、この配列を洗浄して、非結合の二価性架橋剤と細胞結合分子とを除去する。別の光学的なマスクを用いて、別のウェルや、ウェルの組を脱保護してから、二価性の架橋剤で覆って、配列に2回目の処理を行ない、その後、脱保護されたアミノ基をもつ、この第二のウェル、またはウェルの組に結合する別の細胞結合分子による処理を行なう。二価性架橋剤と細胞結合分子による第二の処理を除去するために、配列を洗浄する。このように、光による脱保護化、特異的な分子の化学的クロスリンキング、およびさまざまなマスクの下での洗浄を繰り返すこ

とによって、細胞結合分子の不均一な配列が作製される。または、一個のステップで、架橋試薬を、細胞結合分子とともに、脱保護されたウェルに輸送することもできる。光学的なマスクを用いて、脱保護されて露出したアミノ基の数を調節することによって、または、光反応性架橋剤に対する照射量を調節することによって、付着した細胞結合分子の濃度勾配を生成することができる。

次に、修飾された微細にパターン化された化学物質の配列を用いて、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を

作製する。一つの実施形態において、懸濁した細胞を配列上に導入することによって、修飾された微細にパターン化された化学物質の配列に細胞を「接種」し、細胞をウェルに結合させ、その後、結合しなかったり、弱く結合した細胞を取り除くために薄片を洗浄する。ウェルの中の特異的な化学的環境と、各ウェルを取り巻く疎水的な環境とが相まって、ウェルのみへの細胞の選択的な結合を可能にするため、この細胞はウェルの中でだけ結合している。さらに、特異的な細胞結合分子によって、ウェルを修飾すると、細胞が、特異的なウェルに結合できるようになり、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を作出する。さらに、ウェルに特異的に結合する細胞表面分子は、天然に存在するものでもよいし、細胞が、修飾されたウェルと特異的に相互作用して結合させるために、細胞膜通過分子に融合させた「ウェル結合」分子を発現させることによって、遺伝子工学的に作出されたものでもよい。異なった細胞認識分子をもつウェル配列の作出によって、一つのウェル、一群のウェル、または配列全体で、細胞の混合集団に由来する細胞を特異的に「認識」し、増殖させ、スクリーニングすることができるようになる。

一つの実施形態において、培養培地で、1ml 当たり約 10^3 から 10^7 細胞の範囲の濃度に懸濁した細胞を、ウェルに接触させて、室温から37℃までの範囲の温度で、1分から120分間インキュベートする。そして、培養培地、または、

非結合の細胞を結合した細胞から引き離すための高濃度溶液を用いて、非結合の細胞をウェルから洗い流す (Channavajjalaら、J. Cell Sci. 110:249-256, 199

7)。好ましい実施形態において、1 ml 当り約 10^5 から 10^6 個細胞の範囲内の濃度に懸濁した細胞を、ウェルに接触させて、37℃で、約10分から約2時間の範囲でインキュベートする。

細胞懸濁液中の細胞濃度によって、化学的に修飾されたウェルに細胞を付着させる時間によって、および/または、ウェルの中の細胞結合分子の濃度によって、ウェルに付着する細胞の濃度を調節する。細胞付着処理の一つの実施形態において、1 ml 当り約 10^3 から 10^7 個の細胞を、1 cm² 当り0.1nmoleから100nmoleの細胞結合分子を含むウェルと一緒に、室温と37℃間の温度で、1分から120分間インキュベートする。好ましい実施形態において、1 ml 当り約 10^5 から 10^6 個の細胞を、1 cm² 当り10nmoleから100 nmoleの細胞結合分子を含むウェルと一緒に、約37℃で、10分から2時間インキュベートする。

一つの実施形態において、Bellら、J. Histochem. Cytochem. 35:1375-1380, 1987;Pootら、J. Histochem.Cytochem. 44:1363-1372, 1996;Johnson, J. Elect. Micros.Tech. 2:129-138, 1985によって説明されているようにして、細胞を、ウェルに化学的に固定することもでき、後になって、抗体、核酸のハイブリダイゼーションプローブ、またはその他のリガンドなどの発光性標識し

た分子によるスクリーニングに用いることができる。

別の実施形態において、細胞の化学的性質、または分子の特性を示す発光性の指示薬で細胞を修飾し、不均一で微細にパターン化された化学物質の配列の上に接種し、生きた状態で解析することができる。このような指示薬の実例は、Giulianoら、Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24:405-434, 1995;Harootunianら、Mol. Biol.Cell4:993-1002, 1993;Postら、Mol. Biol. Cell 6:1755-1768, 1995;GonzalezとTsien, Biophys. J. 69:1272-1280, 1995;Swaminathanら、Biophys. J. 72:1900-1907, 1997、およびChalfieら、Science 263:802-805, 1994において提供されている。細胞膜を通過する拡散移動 (Haugland、蛍光プローブと研究試薬ハンドブック、第6版、モレキュラー・プローブ社 (Molecular Probe Inc.) , Eugene, 1996において概説されている)、細胞膜の機械的な攪乱 (McNeillら、J. Cell Biology 98:1556-1564, 1984;ClarkeとMcNeil、J. Cell Science

102:533-541, 1992;Clarkeら、BioTechniques 17:1118-1125,1994)、または、指定された条件下で、細胞で発現させるための遺伝子工学的工夫など、さまざまな物理的な方法の一つ、またはそれらの組み合わせによって、指示薬を、配列の上に接種する前または後に、細胞の中に導入することができる。(Chalfieら, 1994)。好ましい実施形態において、この細胞は、発光性のレポーター遺伝子を含んでいるが、化学発光性蛋白質をコードするレポ-

ーター遺伝子など、この他のタイプのレポーター遺伝子も適している。細胞の生活環境の間、または、薬剤もしくはその他の反応性物質との接触した時に発光させることによって報告させると、生きた細胞を調べて、細胞の生理学的な状態を解析することができるようになる。

本発明の別の局面において、基板上のウェルの中で、細胞が、修飾された微細にパターン化された化学物質の配列に不均一に結合している、不均一な微細パターンをもつ細胞配列が提供される。不均一な微細パターンをもつ細胞配列は、その下にある不均一に修飾された微細にパターン化された化学物質の配列が、異なる特異性をもつ多様な細胞結合部位を提供するために、不均一である。どのような細胞型でも、その細胞型に特異的に結合することができる分子が、微細にパターン化された微細にパターン化された化学物質の配列に存在していれば、不均一な微細にパターン化された細胞配列の上に配列させることができる。不均一な微細にパターン化された細胞配列にとって好ましい細胞型には、リンパ細胞、癌細胞、ニューロン、菌類、細菌類、およびその他の原核生物、および真核生物が含まれる。例えば、図3Aは、表面をパターン化されたチップ上で増殖し、2種類の蛍光プローブ（アクチンを染色するためのローダミンと、核を染色するためのヘキスト）で標識された線維芽細胞を含む、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を示しており、一方、図3Bは、スポットされたパターンの中で増殖させた線維

芽細胞（L929細胞と3T3細胞）を含む、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を、2種類の蛍光プローブで標識し、異なった倍率で可視化したものを示している。

不均一な微細パターンをもつ細胞配列で用いることができる細胞結合分子の例には、抗体、レクチン、および細胞外基質蛋白質が含まれるが、これらに限定はされない。または、特異的な細胞表面マーカーを発現するように、遺伝子工学的に作出された細胞は、修飾されたウェルに直接、選択的に結合することができる。不均一な微細パターンをもつ細胞配列は、固定された細胞、または生細胞を含むかもしれない。好ましい実施形態において、不均一な微細パターンをもつ細胞配列は、細胞の化学的性質、または分子の特性を指示する発光指示薬によって「標識」された細胞のような生細胞を含むが、これらに限定はされない。

本発明の別の局面において、細胞を解析するための方法で、その細胞が、少なくとも1個の発光レポーター分子を含む、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を調製すること、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を液体輸送システムに接触させて、不均一な微細パターンをもつ細胞配列への試薬の輸送を可能にすること、全てのウェルからの発光シグナルを同時に検出して、応答を示すウェルを同定できるように、低倍率で、不均一な微細パターンをもつ細胞配列全体の発光画像を得ることによって、高速処理スクリーニングを行なうことを含む方法が

提供される。引き続いて、異なった生理学的特性とスペクトル特性をもつ発光試薬の組合せを用いて、応答しているウェルの中で、高容量検出を行ない、不均一な微細パターンをもつ細胞配列をスキャンして、細胞の中の発光レポーター分子からの発光シグナルを得、この発光シグナルをデジタルデータに変換し、このデジタルデータを利用して、細胞の中の発光レポーター分子の分布、環境、または活性を決定する。

不均一な微細パターンをもつ細胞配列の好ましい実施形態は、前記で開示されている。液体輸送システムの好ましい実施形態において、チャンバーを、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を含む基板とつなぎ合わせる。このチャンバーは、好ましくは、ガラスかプラスチック、またはシリコンで作られるが、基板として使用できる、その他の素材も適している。図4に示されているチャンバー12の一つの実施形態は、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10のウェル4に適合する、食刻部位配列13をもっている。さらに、微量液体チャンネル14は、食刻部位

13に液体を供給するために食刻されている。一つながりの「排水」チャンネル16は、食刻部位13からの余剰の液体を除去するためにあるが、ウェルに結合させることもできる。チャンバー12と、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10とが一緒になって、カセット18を構成する。

このように、チャンバー12を用いて、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10に、液体を輸送する。この液体

には、特定の薬剤、蛋白質、リガンド、または、細胞の表面で発現される部分、または細胞に取り込まれる部分と結合する、その他の物質が含まれるが、これらに限定はされない。不均一な微細パターンをもつ細胞配列10と相互作用する液体には、薬剤を包んでいるリポソームも含まれうる。一つの実施形態において、このようなリポソームは、光互換性の物質から形成され、光反応性合成ポリマーのように、光に当たると、薬剤を放出する（WillnerとRubin、Chem. Int. Ed. Eng 1.35:367-385, 1996において概説されている）。チャンネル14の中で同時に、薬剤をリポソームから放出することができる。または、各チャンネル、またはチャンネルの列を別々に照明して、連続的に薬剤を放出することもできる。このような調節された薬剤の放出は、動力学的研究や、生細胞の研究で用いることができる。毛細管現象技術分野でよく知られている微小バルブと微小ポンプとを組み合わせることによって、液体輸送の調節を行なうことができる。（米国特許第5,567,294号；米国特許第5,527,673号；米国特許第5,585,069号；すべてが、参照してここに組み込まれる）

図5に示されている、チャンバー12の別の実施形態は、ウェル4が、チャンバー12の食刻部位13の中に嵌り込むことができるよう、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10のウェル8よりも僅かに大きい、チャンバーの食刻部位13に適合した微量液体チャンネル14の配列をもっている。スペーサー支持体20が、チャンバー12と不均一な微細パ

ターンをもつ細胞配列10の間の、接触面に沿って置かれている。チャンバーの盛り上がった領域上に、エラストマー、またはその他の粘着性状のコーティングを

用いて、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10とチャンバー12を封印することができる。チャンバー12の食刻部位13のそれぞれを、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10の中の細胞の増殖および/または健康を支える培地で、個別に、または均一に満たすことができる。さらなる実施形態において(図6)、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10のすべてのウェルが同じ溶液で処理されるため、チャンバーは、微量液体チャンネルをもっていない。

薬剤、またはその他の物質の輸送は、以下のような、チャンバーのさまざまな改変を用いて行なわれる。細胞配列との相互作用を調べようとする薬剤溶液を、96穴の微量滴定用プレートから、微小毛細管24の配列の中に入れることができる(図7)。微小毛細管24の配列は、チャンバー12の微量液体チャンネル14の一つずつに対応しており、溶液が、微小毛細管24からチャンネル14の中へ流れ込むか、押し出されるようになっている。不均一な微細パターンをもつ細胞配列10を逆さまにして、ウェル8が、溶液で満たされた食刻部位13の中に沈むようにさせる(図7B)。液体と不均一な微細パターンをもつ細胞配列10との間の相互作用が起これば、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10から発出される発光シグナルを、直接測定することができ、または、後処理、固定、および標

識するために、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10をチャンバーから引き離すことができる。細胞配列の設置と除去は、ロボット、および/または水力学的機構によって行なうことができる(SchroederとNeagle, 1996)。

図7に示されているチャンバー12の一つの実施形態において、チャンネルと適合する食刻部位13は、チャンバーの中に、化学的に食刻されている(PrimeとWhitesides, 1991; Lopezら, 1993; MrksichとWhitesides, 1996)。食刻部位13は、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10のウェル8よりも直径が大きい。これによって、細胞と少量の液体のための空間を残して、チャンバー12を、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10に接触させたまま封印することが可能になる。チャンバー12の食刻部位13の各列の中に、微量液体チャンネル14が食刻されている。微量液体チャンネル14の各々は、チャンバー12の向かい合う2つの縁からのびており、両方の縁は開口している。チャンバー12の縁と接触した、液体を含む微小毛

細管24を置くことによって、一本の列の食刻部位13が、チャンネル14と液体で結ばれる。連結したチャンネル14の各列を、同時に、または連続的に満たすことができる。バルブとポンプ、または毛細管現象によってチャンネル14を一杯にすると、チャンバー12の各チャンネルが一杯になり、チャンネル14によって連結されている食刻部位13の列の中で、各々の食刻部位13を一杯にしなが、薬剤が流れてゆく。

チャンバー12のさらなる実施形態において、一段高くした貯蔵容器28とチャンネル14を、図8bに示されているように、チャンバー12の表面に置くことができる。好ましい実施形態において、一段高くした貯蔵容器28とチャンネル14は、ポリテトラフルオロエチレン、またはエラストマー素材から作ることができるが、ダウ・コーニング社 (Dow Corning) によって、商標登録シルガード (SylgardTM) という商品名で製造されているポリ(ジメチルシロキサン)のように、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10に付着することのできる、その他の粘着性の素材から作ることにもできる。この効果は、食刻されたチャンネルをもつチャンバーによるのと同じであり、チャンネルと、その使用も同じである。

図8Aに示されているチャンバーの別の実施形態において、第一のチャンネル30は、チャンバー12の縁から、第一の食刻部位13、または、一段高くした貯蔵容器28とチャンネルに向かって伸びている。第二のチャンネル32は、反対側の縁から、第一の食刻部位に隣接した第二の食刻部位に向かって伸びている。第一のチャンネル30と第二のチャンネル32は、互いに液体で結ばれてはいないが、チャンネル14、または、一段高くした貯蔵容器28と同じ列にある。

別の実施形態において、図9と10に示されているように、チャンバー12には、各食刻部位13、または一段高くした貯蔵容器28からチャンバーの縁まで伸びているチャンネル

14がある。チャンネル14はすべて、チャンバー12の片側の縁 (図9)、または両方の縁 (図10) から出ている。また、チャンネル14を、チャンネル14が占める空間を最少にするために、食刻部位13の両側に分かれるようにすることができる

。別々の液体チャンネルによって、一度に、一つの列、または一つの凹みに薬剤を充填して、動力学的実験を行なうことができるようになる。

図11に示された、さらに別の実施形態において、各食刻部位13は、チャンネル14の末端と食刻部位13との間にあるプラグ36をもつ対応チャンネル14に、液体によってつながっていて、必要な時まで、注入した溶液が食刻部位13の中に流れ込むのを防いでいる。溶液は、後で用いるために、予めチャンネル14の中に入れておいてもよい。また、一組の連結した食刻部位13の中の末端の食刻部位13の間に、チャンネル14と液体でつながるように、プラグ36を置くこともできる。プラグ36を開放すると、物質が流れて、チャンネル14と液体によってつながっている、すべての食刻部位13を満たす。

一つの実施形態において、プラグ36は、照射されると、親水性になって、薬剤と一緒に凹みの中に流れ込む、光によって切断される架橋剤によってクロスリンクされている蛋白質、炭水化合物、または脂質などの疎水性ポリマーから形成されるが、これらに限定はされない。あるいは、プラグ36は、照射されると、分解されて、溶液と一緒に食刻部位13の中に流れ込む、光によって切断され

る架橋剤によってクロスリンクされている蛋白質、炭水化合物、または脂質などのクロスリンクしたポリマーから形成されている。

不均一な微細パターンをもつ細胞配列10とチャンバー12とを含むカセット18は、発光読み取り機器の中に挿入される。発光読み取り機器は、カセットを操作し、環境（例えば、生細胞にとっては重要な温度）を制御し、ウェルへの溶液の輸送を制御し、また、細胞の配列から出てくる発光を、一度にウェルを一個ずつ、または、全部の配列を同時に解析する光学器械的な装置である。好ましい実施形態（図12）において、発光読み取り機器は、読み取り器として、蛍光顕微鏡44を用い、カセットを操作するためにはマイクロロボット技術を用いた集積回路の監視装置を含む。貯蔵用区画箱48に、カセット18が保存され、コンピュータ56によって制御されるロボットアーム50によって引き出される。ロボットアーム50は、発光読み取り機器44の中にカセット18を挿入する。カセット18は、別のロボットアーム52によって、発光読み取り機器44から取り出されて、第二の貯蔵用区画箱

54の中に置かれる。

発光読み取り機器44は、集積回路の「チップ」の欠陥を「スクリーニングする」ために用いられる集積回路監視装置を、発光光学に基づいて改変して設計された光学器械的装置である。環境制御、マイクロロボット、および光学的読み取り器を統合するシステムは、カール・ツ

ァイス社 (Carl Zeiss) [Jena、有限会社]のような会社によって製造される。ロボット操作、液体輸送、および迅速で正確な走査 (scanning) を容易にすることに加えて、2種類の読み取り方式である、高容量法と高速処理法がサポートされている。高容量の読み出しは、アレイスキャン (ArrayScan) 読み取り器 (米国特許出願第08/810983号) によって行なわれるのと本質的には同じである。高容量方式では、不均一な微細パターンをもつ細胞配列上の各位置を、5-40倍、または、それ以上の倍率で画像化し、十分な数のフィールドを記録して、望ましい、測定値の統計的な解析を行なう。

高速処理方式においては、発光読み取り機器44が、0.2倍から1.0倍という、ずっと低い倍率で、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を画像化し、低い解像度を提供するが、一個の画像で、不均一な微細パターンをもつ細胞配列上の全てのウェルを記録できるようにする。一つの実施形態において、20mm×30mmの不均一な微細パターンをもつ細胞配列が、0.5倍の倍率で1000×1500に配列された10 μ m画素の並びいっばいに画像化されると、20 μ m/画素の解像度が得られるが、これは、細胞内の発光分布を区別するのには不十分であるが、一つのウェルの平均的な反応を記録し、また、ウェルの中の特定の細胞のサブタイプを数えるのには十分である。典型的な集積時間は秒単位であるから、自動入力と操作を組み合わせた読み取り技術の高速処理方式によって、1分間に何百

もの化合物のスクリーニングが可能になる。

図13で示されている一つの実施形態において、発光読み取り機器は、コンピュータによって制御されるx、y、z-ステージ64、低倍率の対物レンズ70 (例えば、0.5 \times)、ならびに、それよりも高倍率の一個以上の対物レンズ72をもっている

、コンピュータによって制御されて回転するノーズピース68、励起用フィルター回転子76をもつ白色光源ランプ74、発光フィルター80をもつ、二色性のフィルターシステム78、および、検出器82（例えば、冷却電荷結合素子）を含む、直立式か倒立式の蛍光顕微鏡44である光学器械設計を含む。高速処理方式では、低倍率の対物レンズ70を適当な位置に移して、不均一な微細パターンをもつ細胞配列全体の発光画像を一枚以上記録する。何らかの選択された発光反応を示すウェルを同定して、さらに、米国特許出願第08/810983号で説明されているように、ノーズピース68を回転して、より高倍率の対物レンズ72を選択し、さらに、細胞および細胞内の高容量スクリーニングのために「選択された」ウェルを中心に置くために、x、y、z-ステージ64を調節して、高容量スクリーニングによる解析が行なわれる。

代替的な実施形態において、発光読み取り機器44は、共焦照明方式、または標準的な照明方式のいずれかでスキャンされたレーザー光線を利用することができる。カール・ツァイス社（Carl Zeiss）（Jena、有限会社、ドイツ）によって製造されているように、または、Denkra

（Science, 248:73, 1990）において考察されているように、スペクトルの選択は、多数のレーザー線、または、別々のレーザーダイオードによる。

高速処理スクリーニング方式の別の実施形態では、発光励起子の配列（1×8、1×12など）、および、不均一な微細パターンをもつ細胞配列上のウェルの部分集合をスキャンする発光検出器からなる低解像度システムを使用することが含まれる。好ましい実施形態において、このシステムは、束ねられた光ファイバーからなるが、発光励起光を誘発し、同一のウェルから発光放出光を回収するシステムであれば十分である。このシステムによって、不均一な微細パターンをもつ細胞配列全体をスキャンすると、各ウェルから、つまり、細胞、および、細胞が浸かっている溶液の両方から全発光が得られる。この実施形態によって、いわゆる「均一な」アッセイ法である、無細胞系からの発光シグナルの収集が可能になる。

。

図14Aは、発光読み取り機器を用いた高速処理モードと高容量処理モードの両

方式で、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を解析するためのアルゴリズムにおいて、まず、全配列「Aからの応答を測定するために高速処理検出を用いるものを、フローチャートの形式で示している。（図14B）。予め設定した閾値よりも高く反応するウェルは、ヒットしたと見做され、そのウェルの中の細胞を、高容量スクリーニングによって測定する。（図14C）。高容量モード（「B」）では、高速処理モード

（「A」）の過程で測定されたのと同じ細胞パラメータを測定してもよいし、しなくてもよい。

本発明の別の局面において、細胞のスクリーニングシステムが開示されており、ここで、「スクリーニングシステム」という語は、発光読み取り機器、発光読み取り機器の中に挿入することができるカセットで、細胞が少なくとも一つの発光レポーター分子を含む、不均一な微細パターンをもつ細胞配列と、不均一な微細パターンをもつ細胞配列に結合したチャンバーを含むカセット、発光読み取り機器から、データを受け取るためのデジタル検出器、および、デジタル式の検出装置からのデータを受け取り、処理するためのコンピュータ装置を統合したものを含む。

発光読み取り機器の好ましい実施形態、および、不均一な微細パターンをもつ細胞配列とチャンバーとを含むカセットが、上で開示されている。デジタル検出器の好ましい実施形態が、米国特許出願第08/810983号で開示されており、発光読み取り機器からの発光データを捕捉し、それをデジタルデータに変換する高解像度デジタルカメラを含む。好ましい実施形態において、コンピュータ装置は、米国特許出願第08/810983号で説明されているように、デジタル式の検出装置からのデジタルシグナルをコンピュータに運ぶデジタルケーブル、ユーザーと対話し、アッセイ結果を表示するための表示画面、アッセイ結果を処理するための装置、および、データを保存し保管す

るためのデジタル式の保存用媒体を含む。

好ましい実施形態において、本発明の細胞スクリーニングシステムは、上で開

示されている要素の好ましい実施形態を統合したものを含む(図15)。不均一な微細パターンをもつ細胞配列10は、基板4の上のウェル8の中の微細にパターン化された化学物質の配列に結合した細胞を含む。チャンバー12は、不均一な微細パターンをもつ細胞配列10に化合物を加えるための微量液体輸送システムとして用いられ、これら2つを結合させたものは、カセット18を具備する。カセット18は、発光読み取り機器44の中に置かれる。デジタルデータは、上記、および、その全体が、参照してここに組み込まれる米国特許出願第08/810983号で説明されているところにしたがって処理される。米国特許出願第08/810983号で説明されているように、データを、コンピュータ画面86の上に表示し、また、生物情報データベース90の一部にすることができる。このデータベース90は、本発明の方法によって得られたデータの保存と捕捉を可能にし、また、細胞を用いた以前の実験に関するデータの捕捉と保存も可能にする。コンピュータの表示画面の例が、図16に示されている。

本発明は、例示することだけを意図し、ここに添付されている請求の範囲において明らかにされている本発明の範囲を制約すると解釈されるべきではない、添付の実施例を参照することによって、よりよく理解されよう。

実施例1. 特異的なリンパ細胞を付着させるための、不均

一な微細パターンをもつ細胞配列への抗体の結合

1. 用いられた細胞系は、その表面にIgMを発現させない、マウスのB細胞リンパ腫系統(A20)であった。誘導体化するために、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を、20%硫酸に一晩浸漬し、過剰量の蒸留水で2-3回洗浄し、0.1M水酸化ナトリウムでリンスし、吸水して乾燥させて調製した。不均一な微細パターンをもつ細胞配列は、すぐに使用するか、または、後で使用するために、きれいなガラスビーカーの中に置いて、パラフィルムで覆っておいた。

2. 60mmのペトリ皿の中に、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を置いて、3-アミノプロピルトリメトキシシランを、不均一な微細パターンをもつ細胞配列の上にかけて、縁からあふれ出ることなく、完全に覆っていることを確認した(22×22mmの不均一な微細パターンをもつ細胞配列には、約0.2ml、22×40mm

mの不均一な微細パターンをもつ細胞配列には、約0.5ml)。室温に4分間置いた後、不均一な微細パターンをもつ細胞配列を脱イオン水で洗い、吸水して余分な水分を除去した。

3. 不均一な微細パターンをもつ細胞配列を、清潔な60mmペトリ皿の中に置き、グルタルアルデヒド (PBS中2.5%、約2.5ml) とともに、室温で30分間インキュベートして、その後、PBSで3回洗浄した。吸水して過剰なPBSを除去した。

4. ブロッキングのステップの間に、発光性のヘキスト

染色液で、不均一な微細パターンをもつ細胞配列の中の細胞核を標識した。C-DMEM中の適当な数のリンパ細胞 (下記参照) を、15ml のコニカルチューブに移して、最終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ になるようにヘキスト染色液を加えた。5%CO₂ の中37℃で、10-20分間、細胞をインキュベートしてから、室温で7分間、 $1000 \times g$ で遠心分離して沈殿させた。結合しなかったヘキスト染色液を含む上清を除去し、新しい培地 (C-DMEM) を加えて、以下のように、すなわち、22×22mmの不均一な微細パターンをもつ細胞配列あたりに、0.2ml 中に、およそ $1.25-1.5 \times 10^5$ 個の細胞、22×40mmの不均一な微細パターンをもつ細胞配列あたりに、約0.75ml 中に、およそ 2.5×10^5 個の細胞となるように再懸濁した。

5. 不均一な微細パターンをもつ細胞配列を、PBSで簡単に洗浄してから、皿の側面に触れないように、清浄で乾燥した60mmペトリ皿に移した。不均一な微細パターンをもつ細胞配列の上に、注意しながら、上に示した密度で、ピペットで細胞を載せていった。5%CO₂ の中37℃で1時間、この皿をインキュベートした。そして、繰り返しPBSで洗って、結合していない細胞を除去した。

6. 抗体の溶液 (ヤギ抗マウスIgM、またはヤギ抗マウス全血清) を、パラフィルムの上にスポットした (22×22mmの不均一な微細パターンをもつ細胞配列には、50 μl 、22×40mmの不均一な微細パターンをもつ細胞配列には、100 μl) 。不均一な微細パターンをもつ細胞配列を

逆さまにして、スポットの上に置き、気泡をトラップしないように、処理された不均一な微細パターンをもつ細胞配列の表面全体が覆われるようにした。この不

均一な微細パターンをもつ細胞配列を、抗体溶液とともに、室温で1時間インキュベートした。

7. 不均一な微細パターンをもつ細胞配列を、注意しながら、パラフィルムから引き離し、清浄な60mmペトリ皿の中に置いて、PBSで3回洗浄した。そして、2.5mlの10%血清（DMEM、またはハンクスの平衡塩類溶液中のウシ血清、またはウシ胎児血清）を加えて、室温で1時間、非反応部位をブロックする。

8. どちらの細胞系も、抗マウス全血清に結合するはずであるが、X16のみが、抗マウスIgMに結合するはずである。特異的なリンパ細胞系統の、化学的に修飾された表面への結合が、図17に示されている。表面IgM分子をもたないが、IgG分子を発現しているマウスリンパA20細胞系は、ヤギ抗マウスIgMで修飾された表面（図17B）や、コートされていないスライド（図17A）に結合するよりもずっと強く、ヤギ抗マウス全血清で修飾された表面に結合した（図17C）。

実施例2. 高容量、および高速処理のスクリーニング法

脂肪細胞および筋細胞などの細胞の中へのグルコースの取り込みを、インシュリン依存的に刺激するには、細胞内の区画から原形質膜への、GLUT4グルコーストランスポータの移行をもたらす細胞質内プロセスの複合的な協

働が必要とされる。インシュリンが、そのレセプターに結合すると、直接的なシグナル伝達現象、および、移行のプロセスで必要とされる細胞骨格の再編成のような、間接的なプロセスを含む、多数の分子的事象が開始される。アクチン細胞骨格は、細胞質の形成において重要な役割を演じているため、この生きたゲルを制御する、細胞内のシグナルイオンと分子も、GLUT4の移行を媒介するものと考えられる。

2つのレベルでの、インシュリンの模擬薬のスクリーニングは、次のように行なわれる。GLUT4と青色蛍光蛋白質（BFP）との安定したキメラをもつ細胞を、不均一な微細パターンをもつ細胞配列の配列上に並べてから、カルシウムの指示薬（緑色蛍光）であるフルオ-3（Fluo-3）のアセトキシメチルエステル型を流す。そして、微量液体輸送システムを用いて、化合物を並べたもので、置かれた配列を同時に処理し、高速処理モードで、カルシウム応答を示しているウェルについ

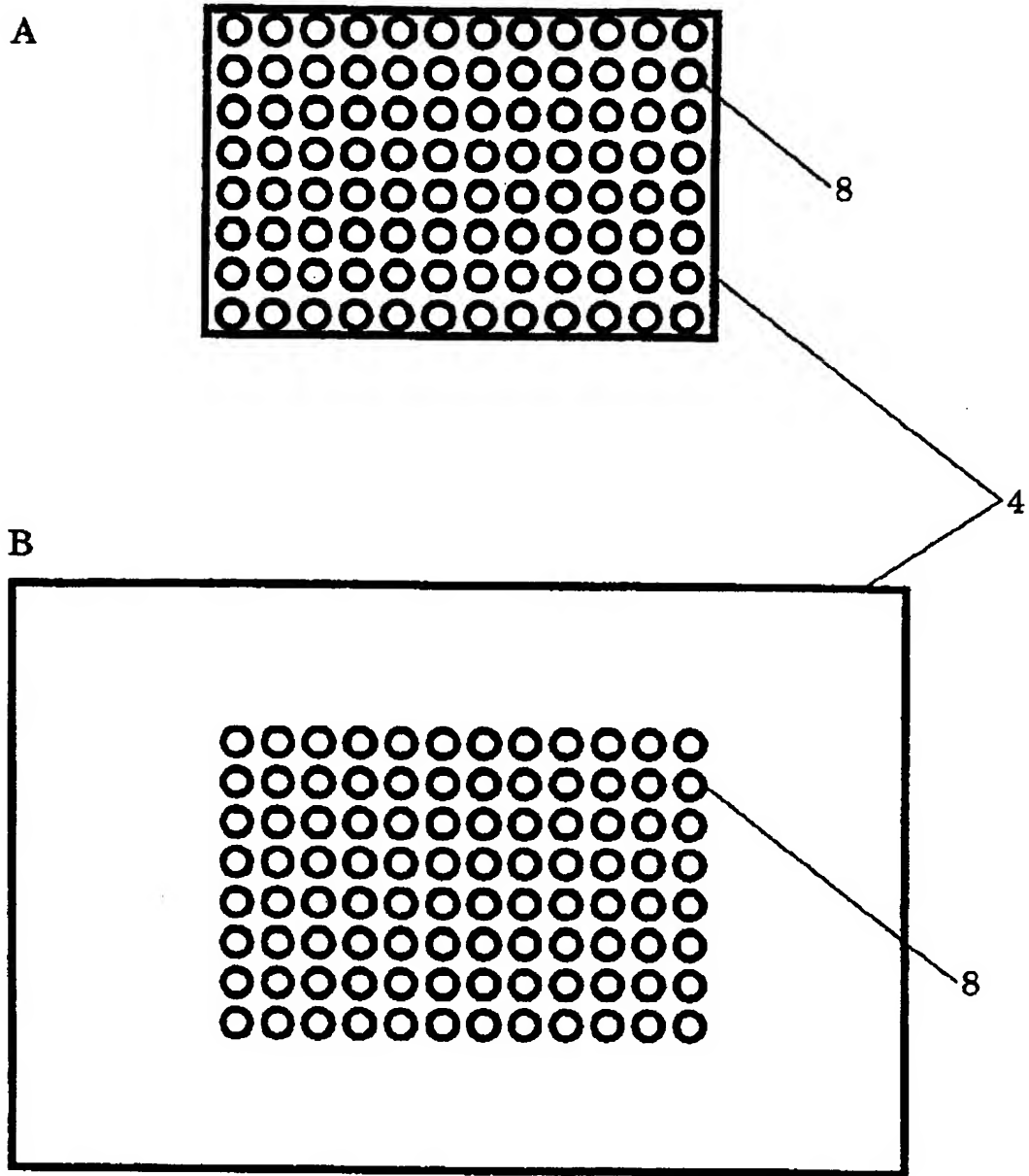
て、不均一な微細パターンをもつ細胞配列全体のフルオ-3 (Fluo-3) 画像の短い配列を解析する。そして、原形質膜へのGLUT4の移行（すなわち、高容量モード）の証拠を得るために、時間と空間で検出される青色蛍光を用いて、応答を誘導した化合物を含むウェルを細胞単位で解析する。

図18は、高速処理モード（図18A）、および高容量モード（図18B）における、不均一な微細パターンをもつ細胞配列全体の連続した画像を示している。図19は、高容量

モードから得られた細胞のデータを示している。

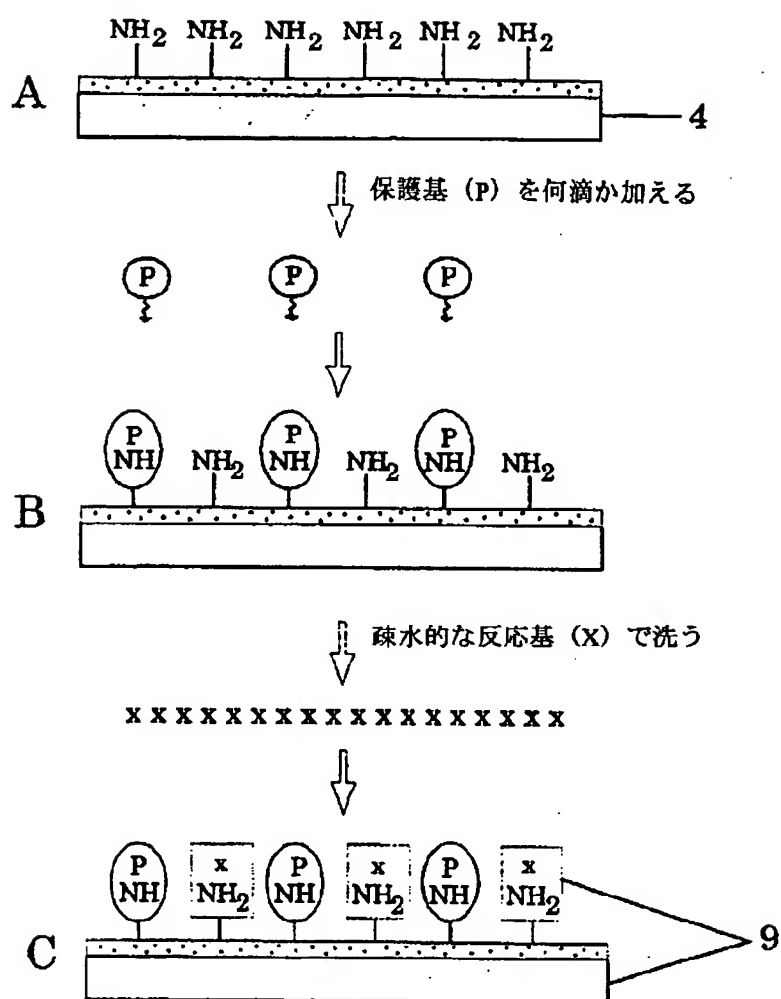
【図1】

Fig. 1



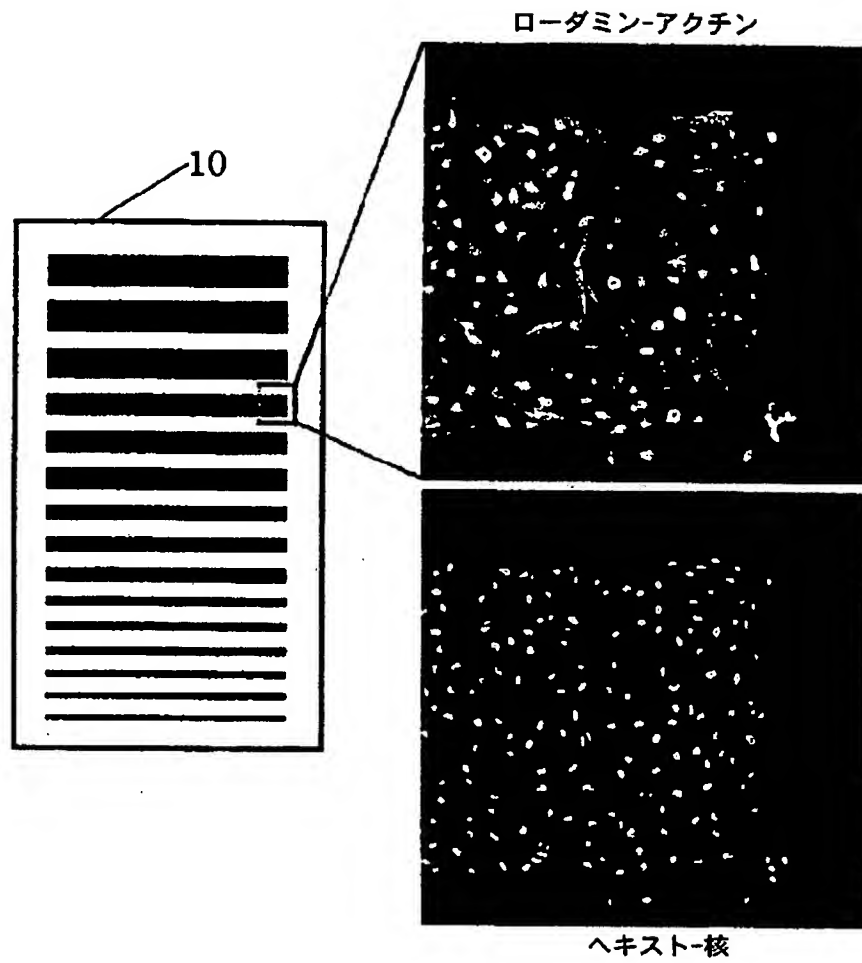
【図2】

Fig. 2



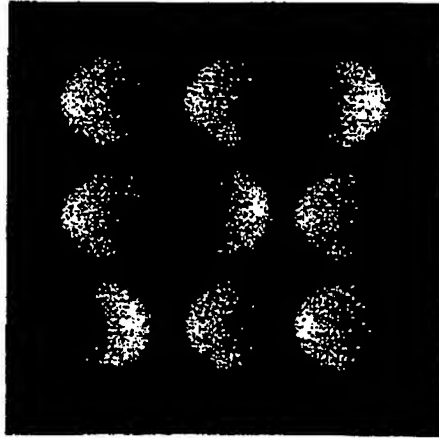
【図3】

Fig. 3A

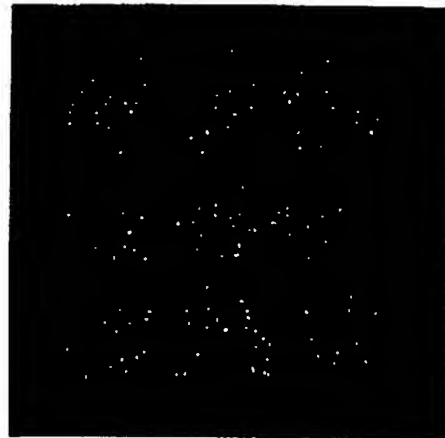


【図3】

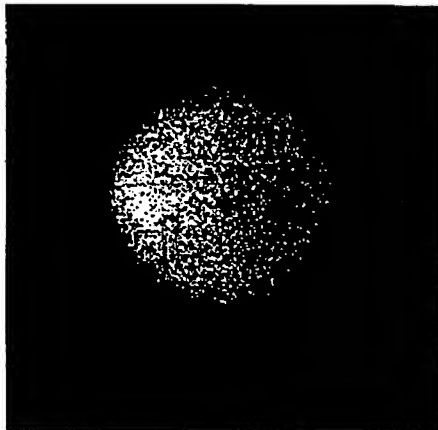
Fig. 3B



200 μm のスポットパターンの位置を同定するために、細胞チップにフルオレセインナトリウムを結合させたもの



パターン化したスポットへの L929 細胞の蛍光細胞付着 (低倍率、4 \times)



400 μm のスポットパターンを同定するために、細胞チップにフルオレセインナトリウムを結合させたもの

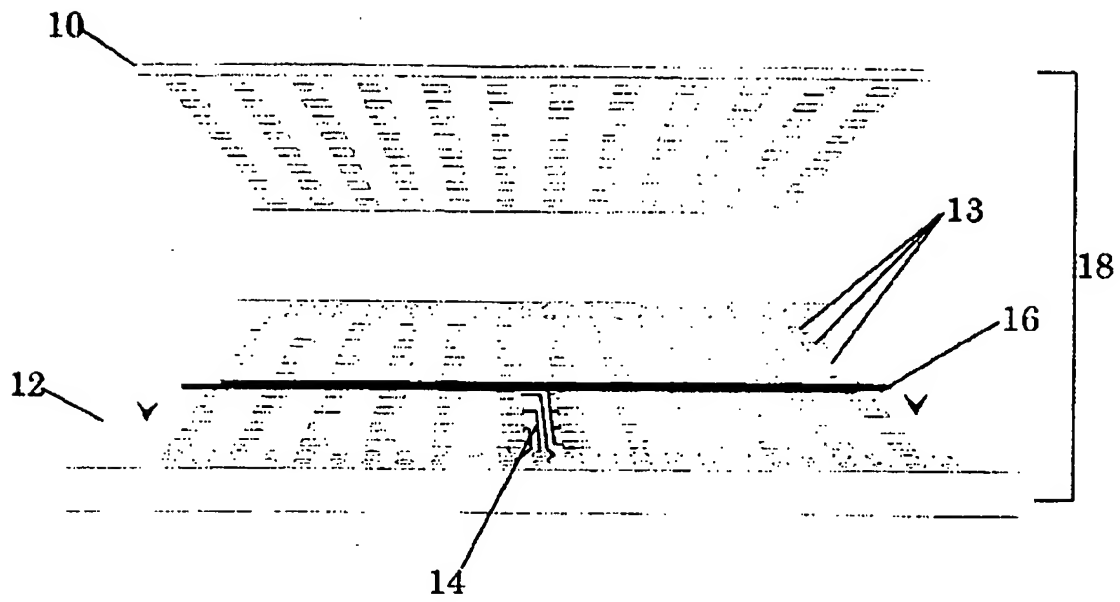


パターン化したスポットへの 3T3 細胞の蛍光細胞付着。同じ細胞の核 (上図)、アクチン (下図) (高倍率、20 \times)



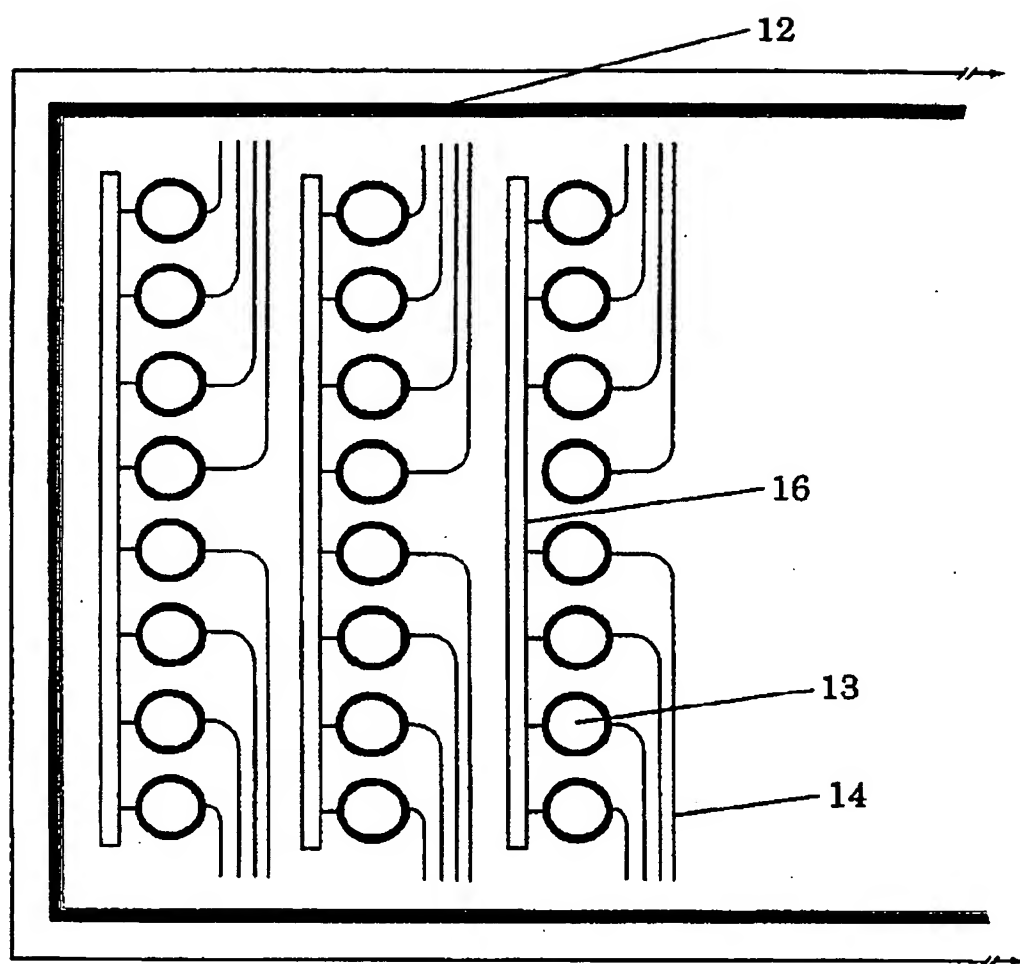
【図4】

Fig. 4



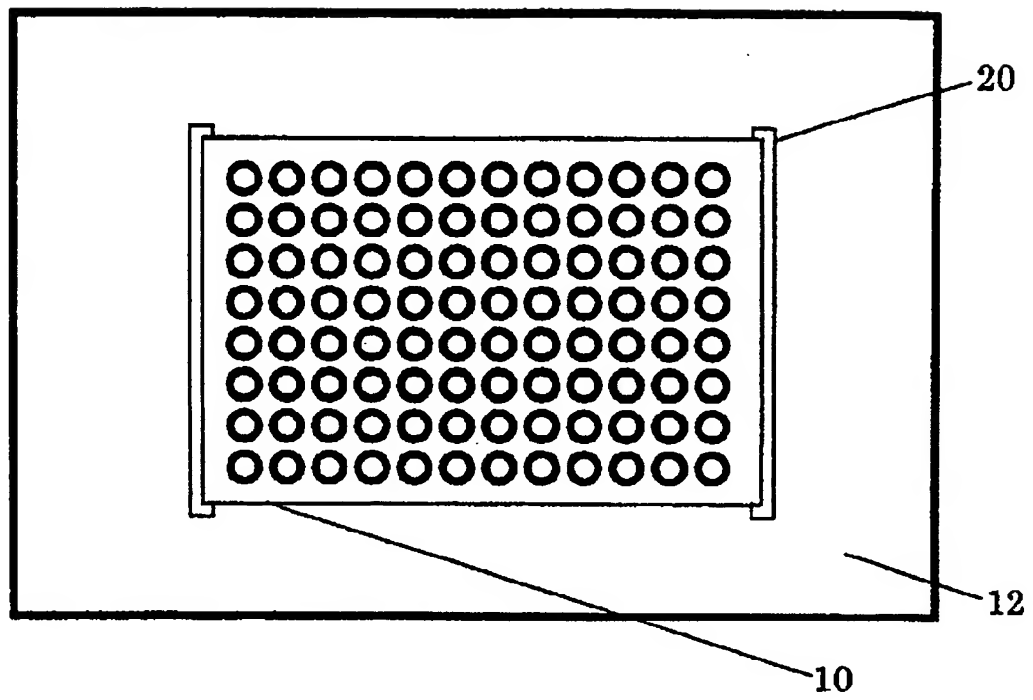
【図5】

Fig. 5



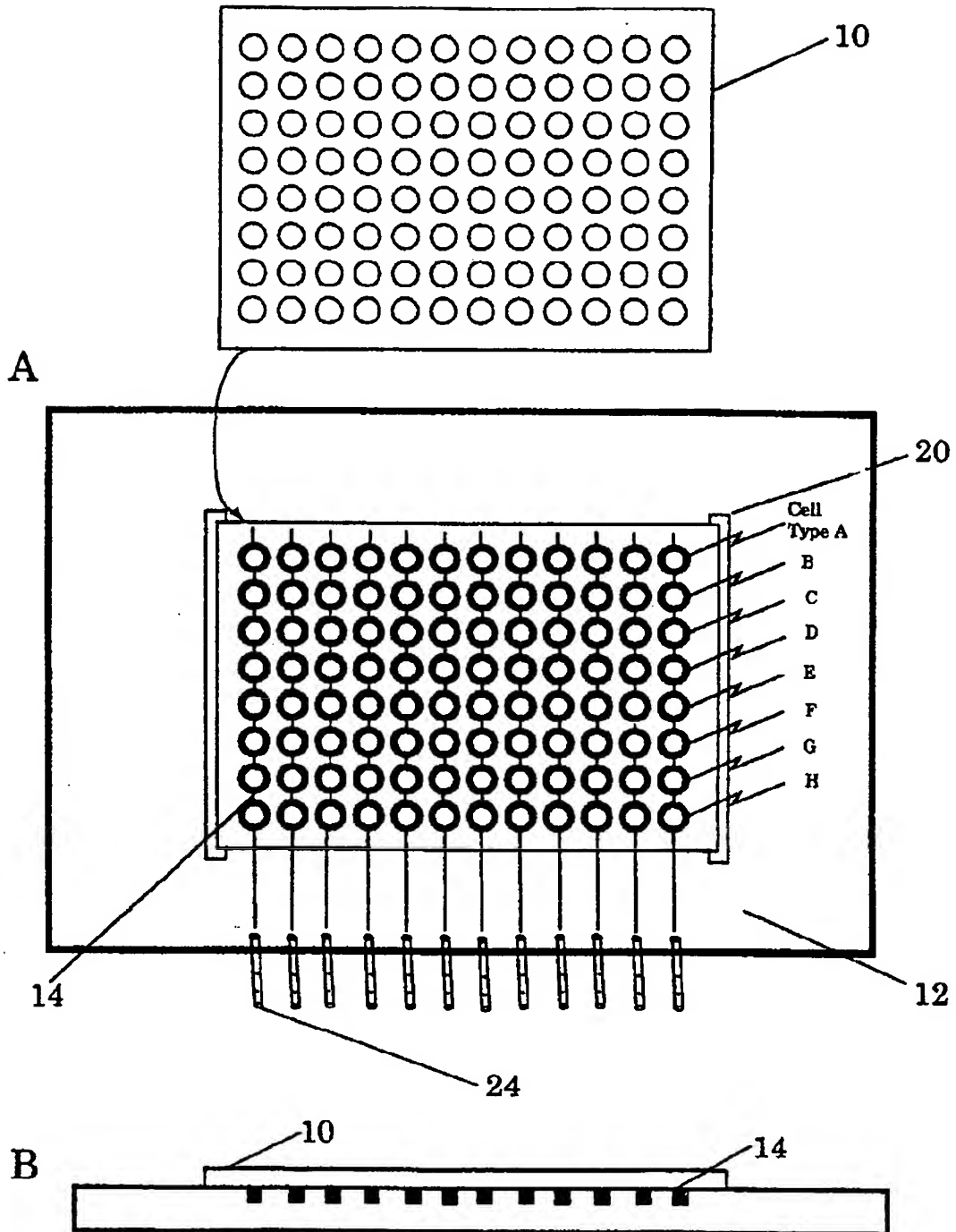
【図6】

Fig. 6



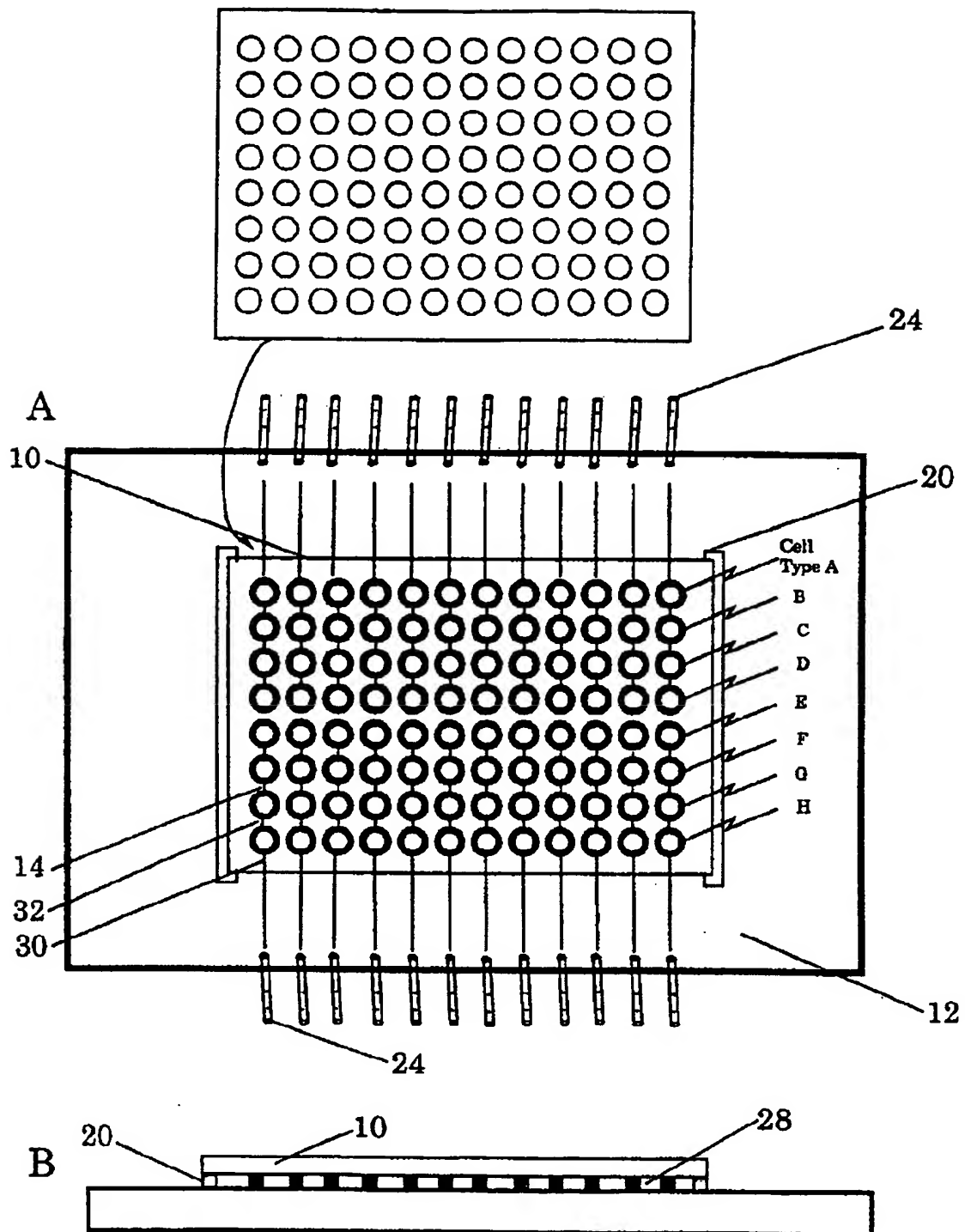
【図7】

Fig. 7



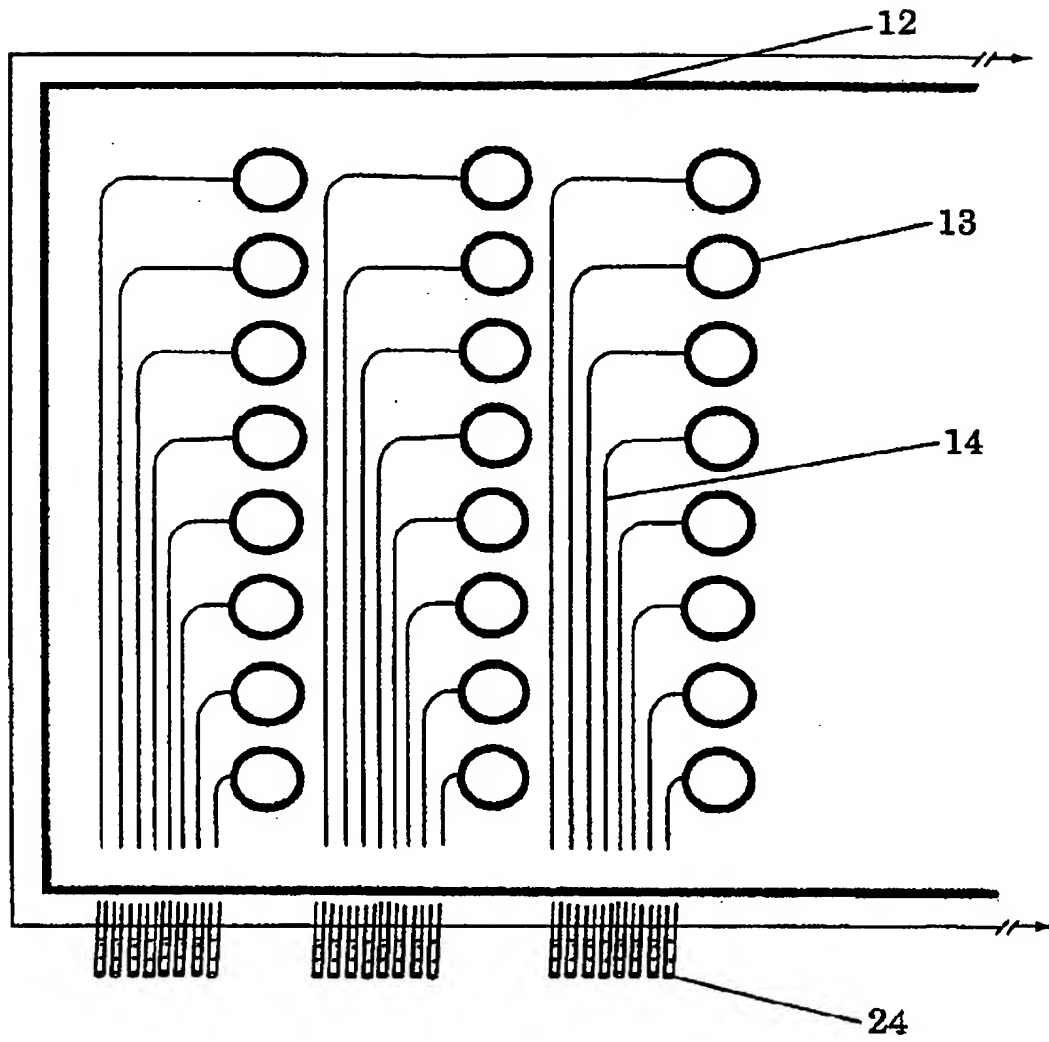
【図8】

Fig. 8



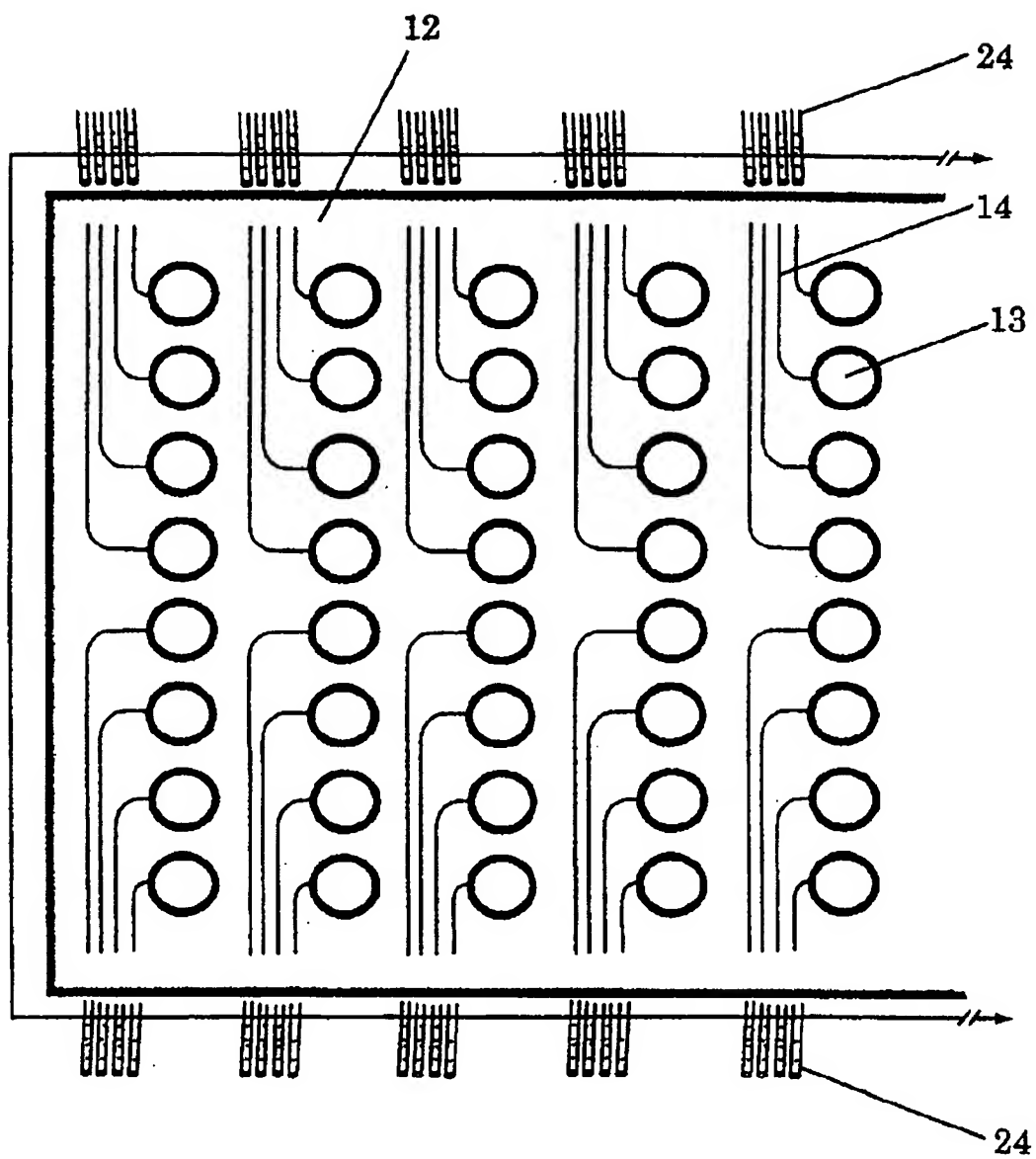
【図9】

Fig. 9



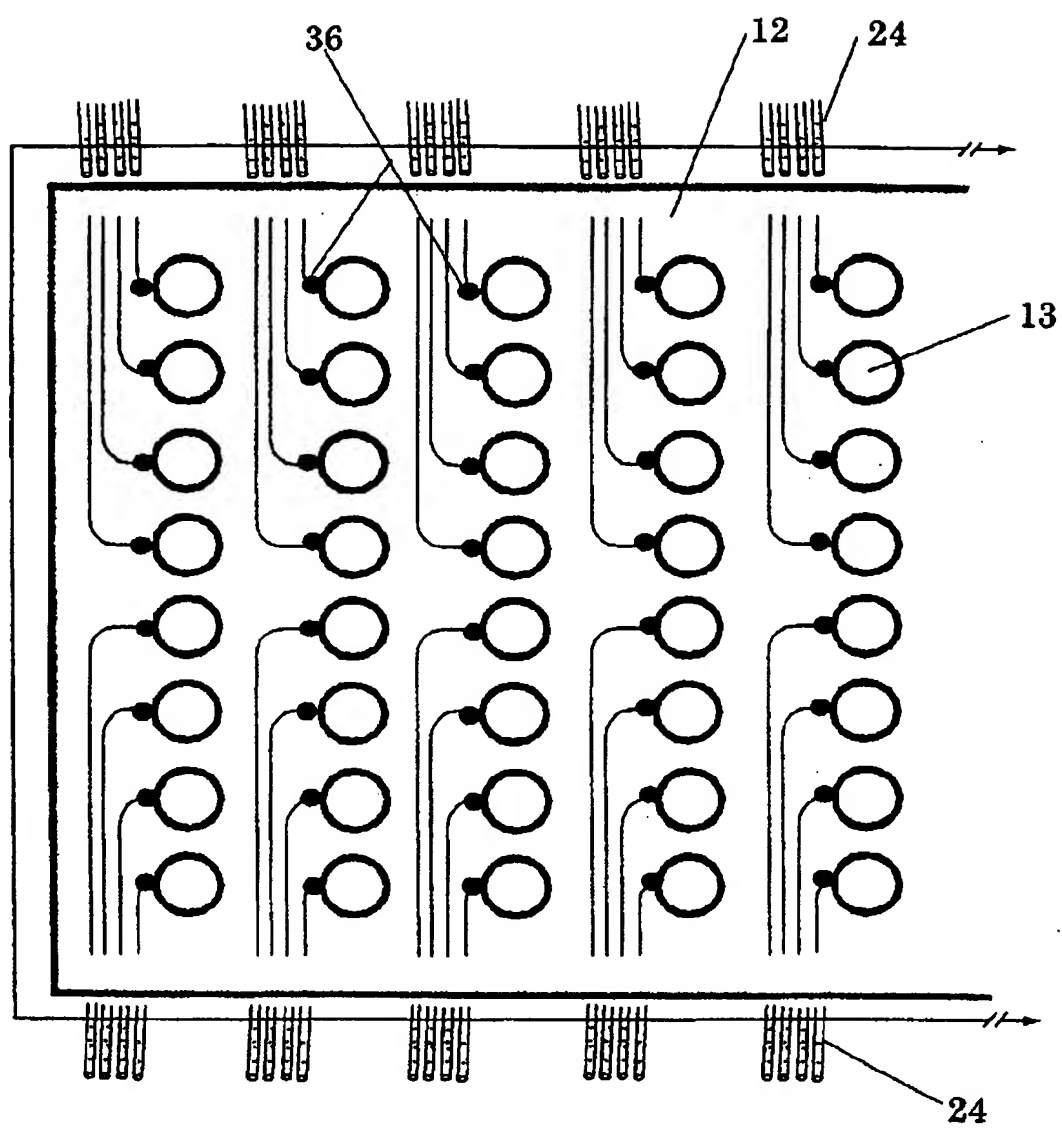
【図10】

Fig. 10



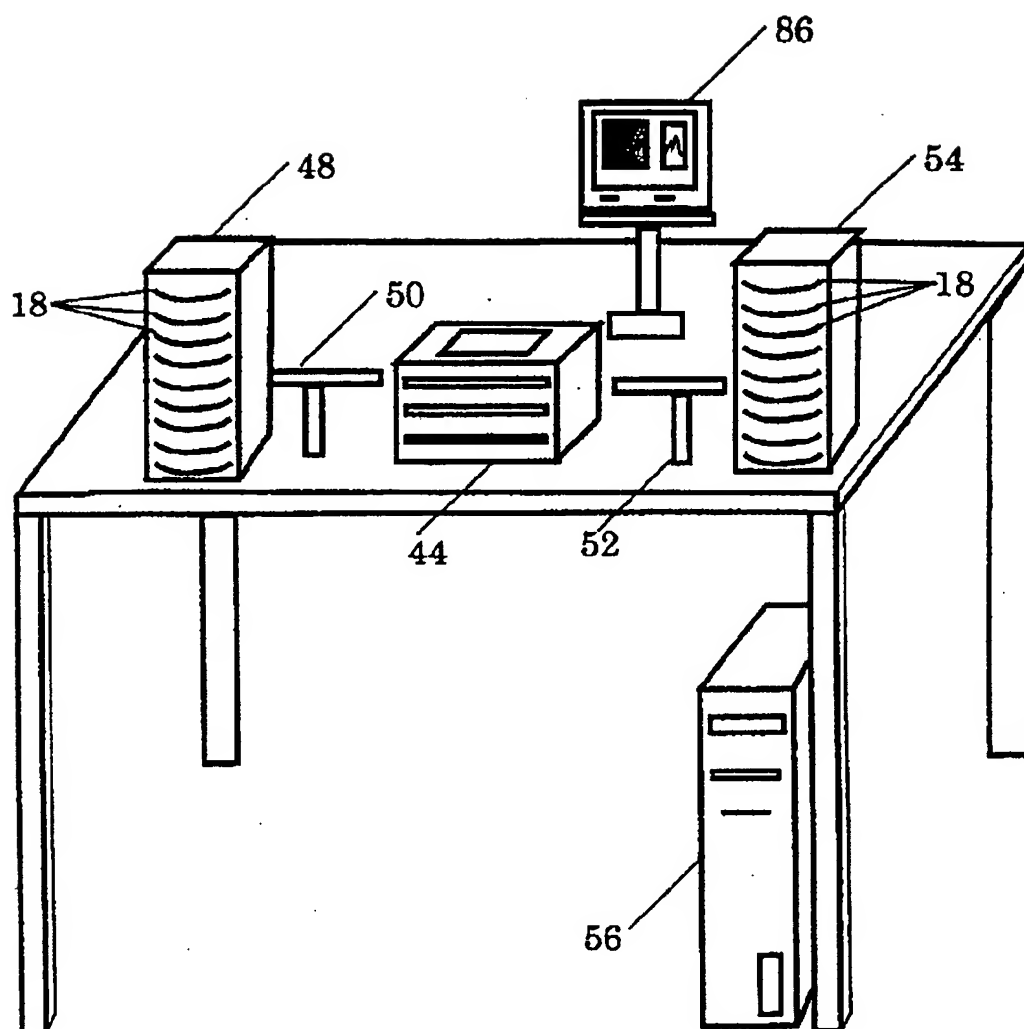
【図11】

Fig. 11



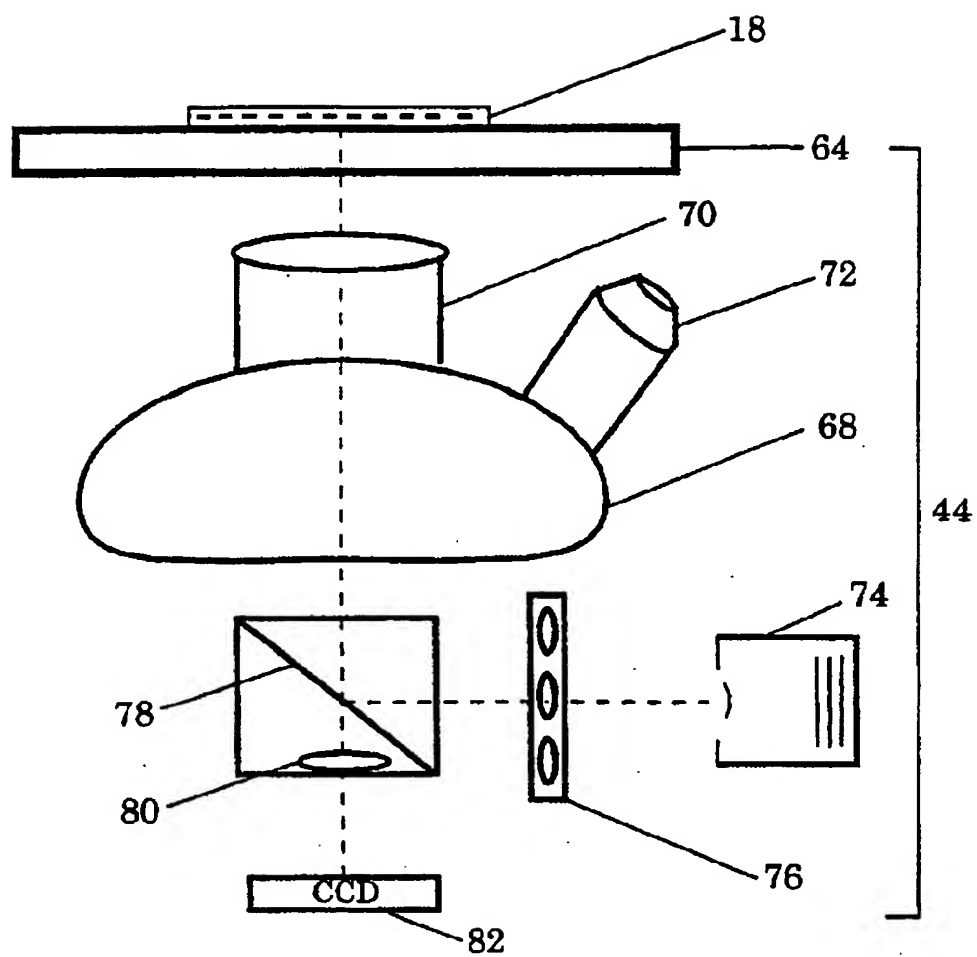
【図12】

Fig. 12



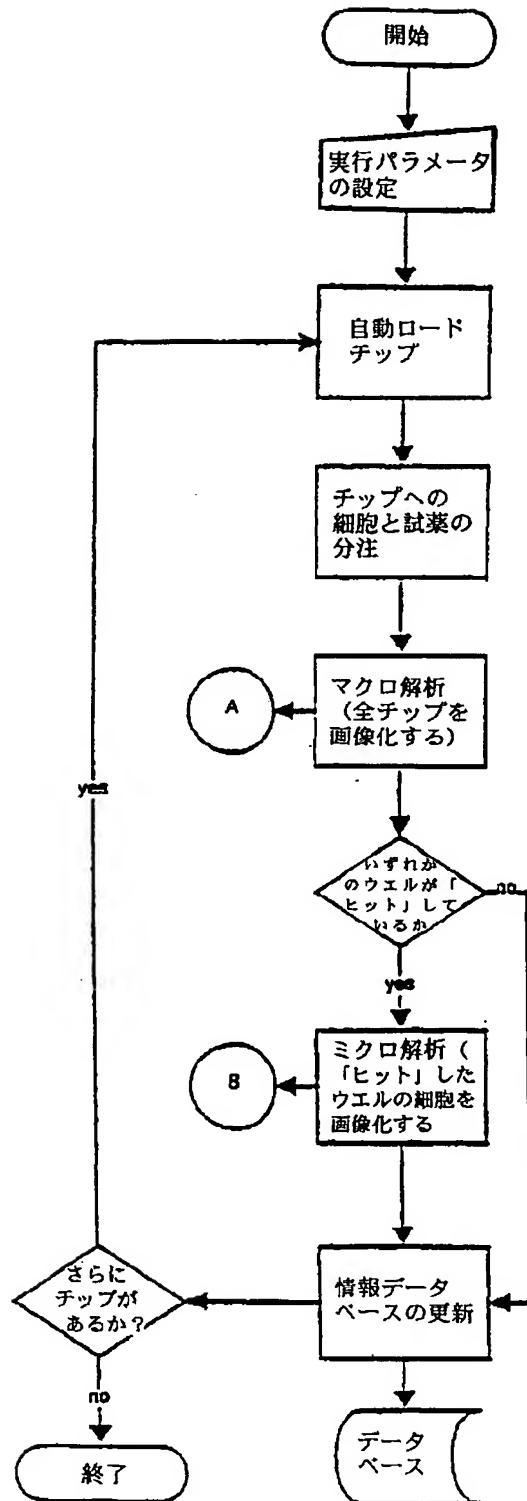
【図13】

Fig. 13



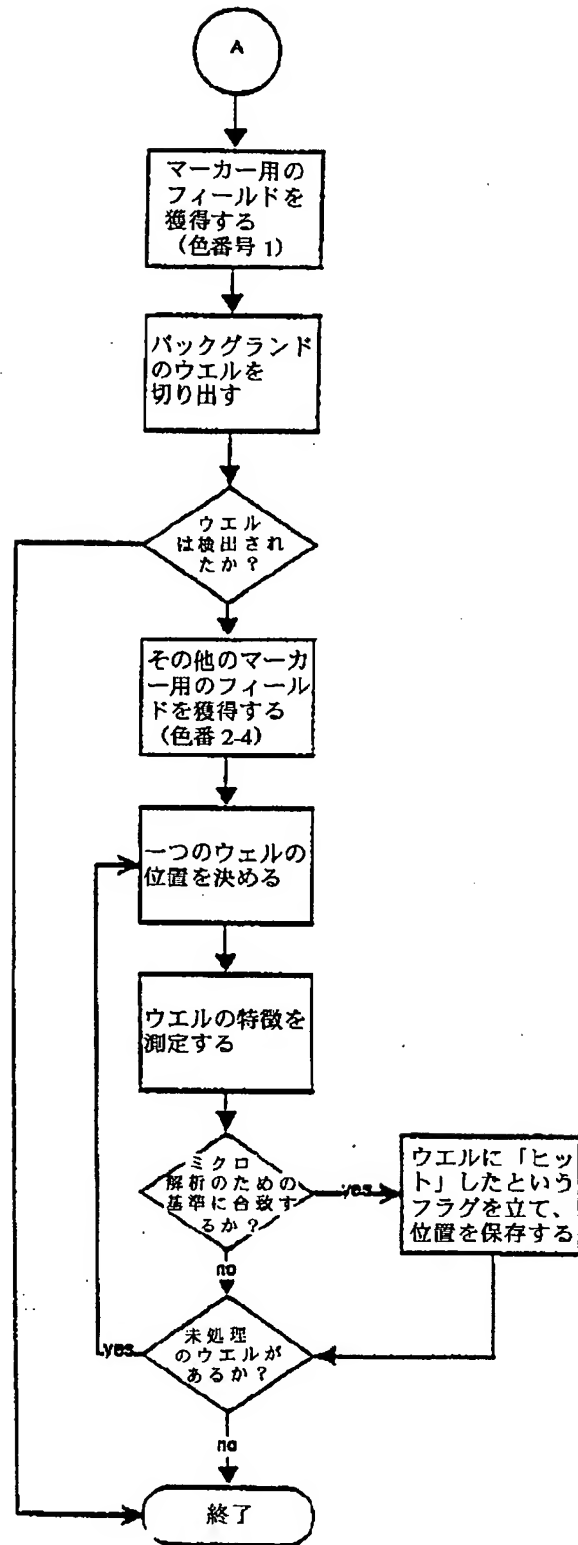
【図14】

Fig. 14A



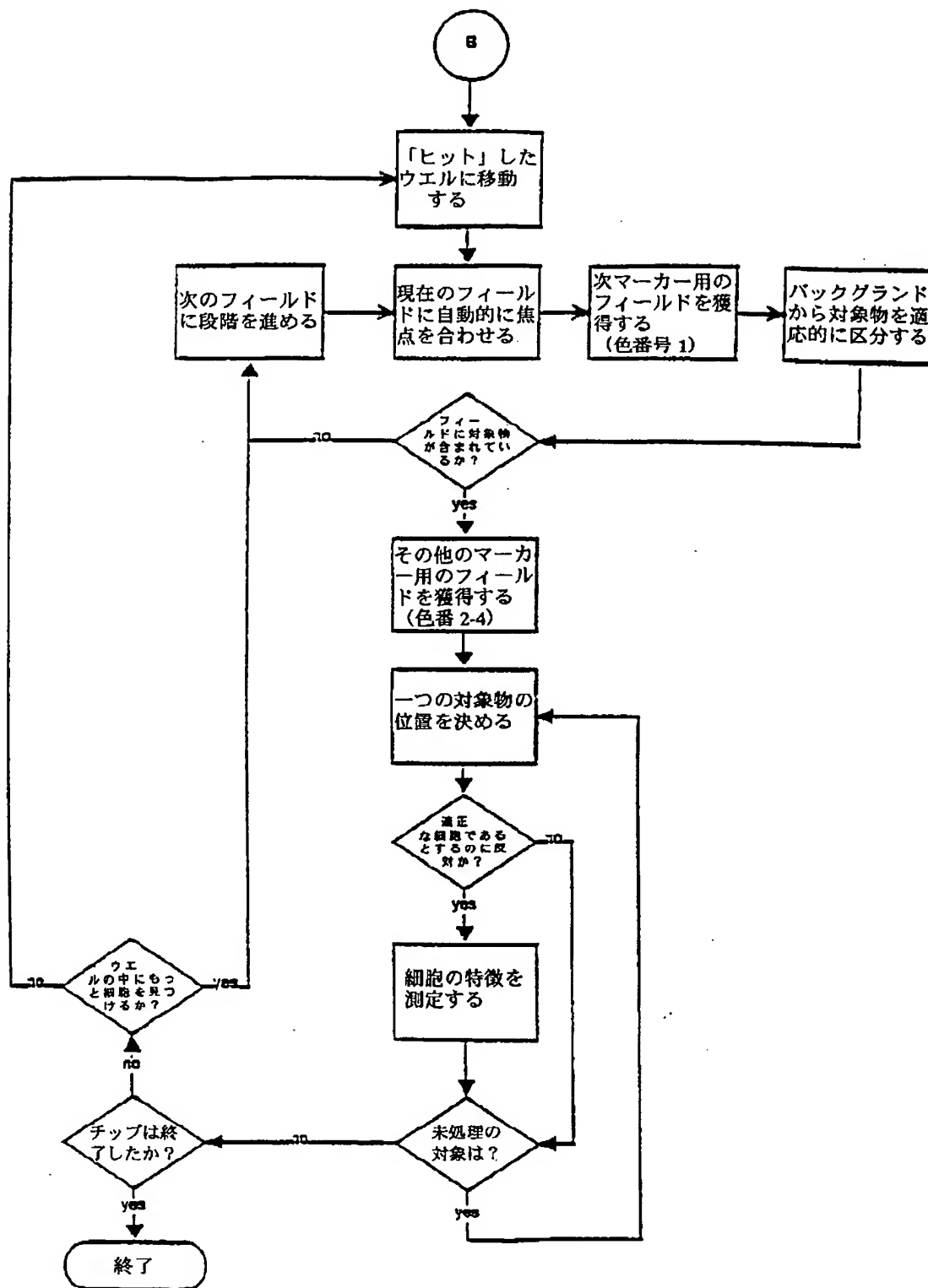
【図14】

Fig. 14B



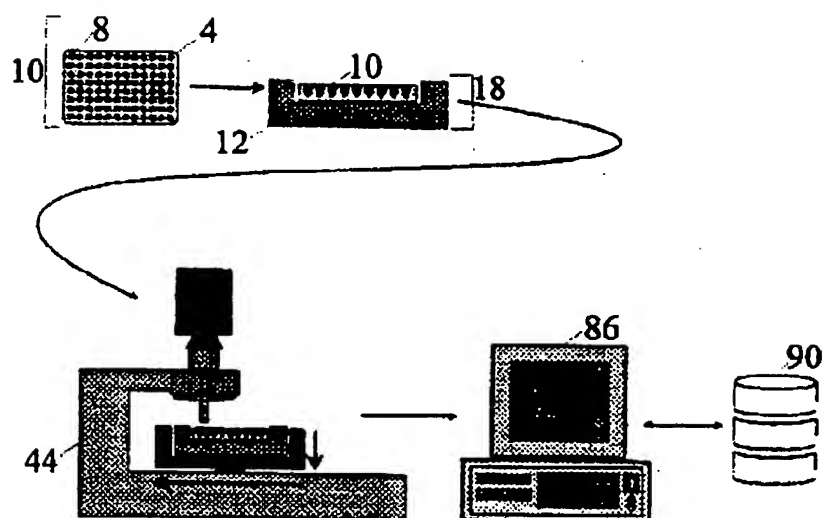
【図14】

Fig. 14C



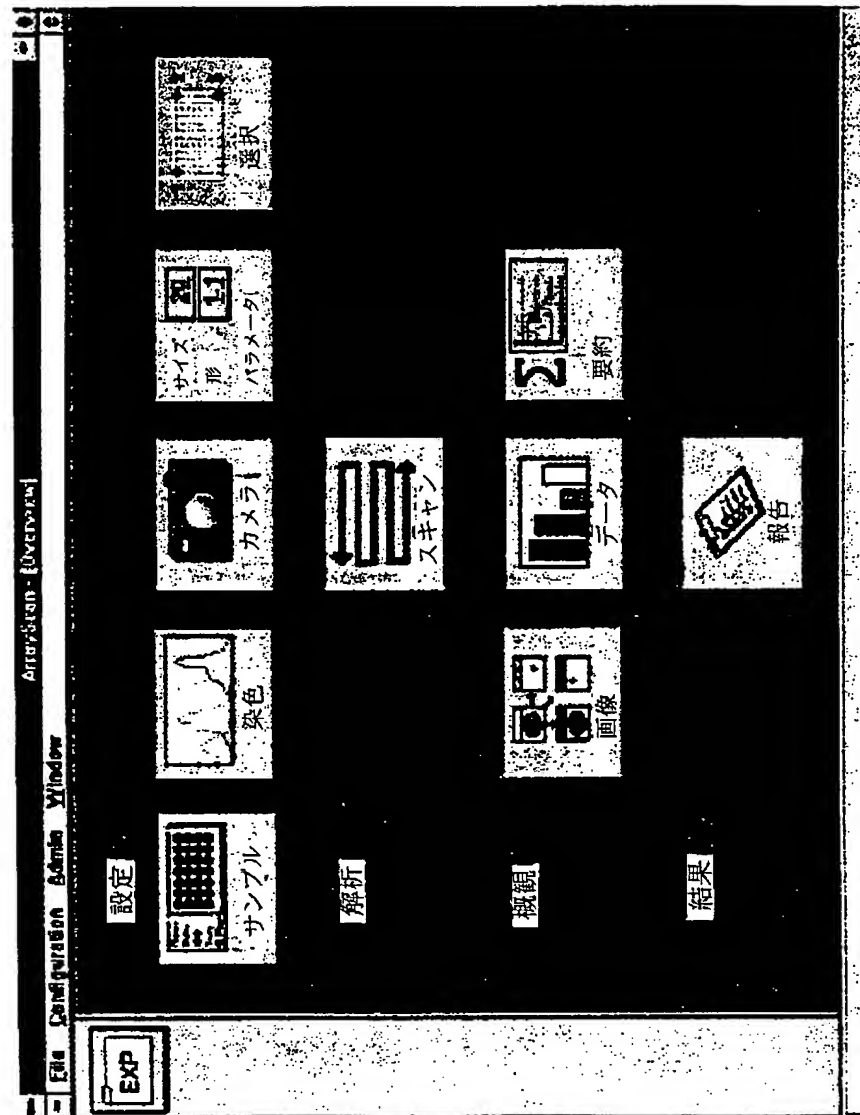
【図15】

Fig. 15



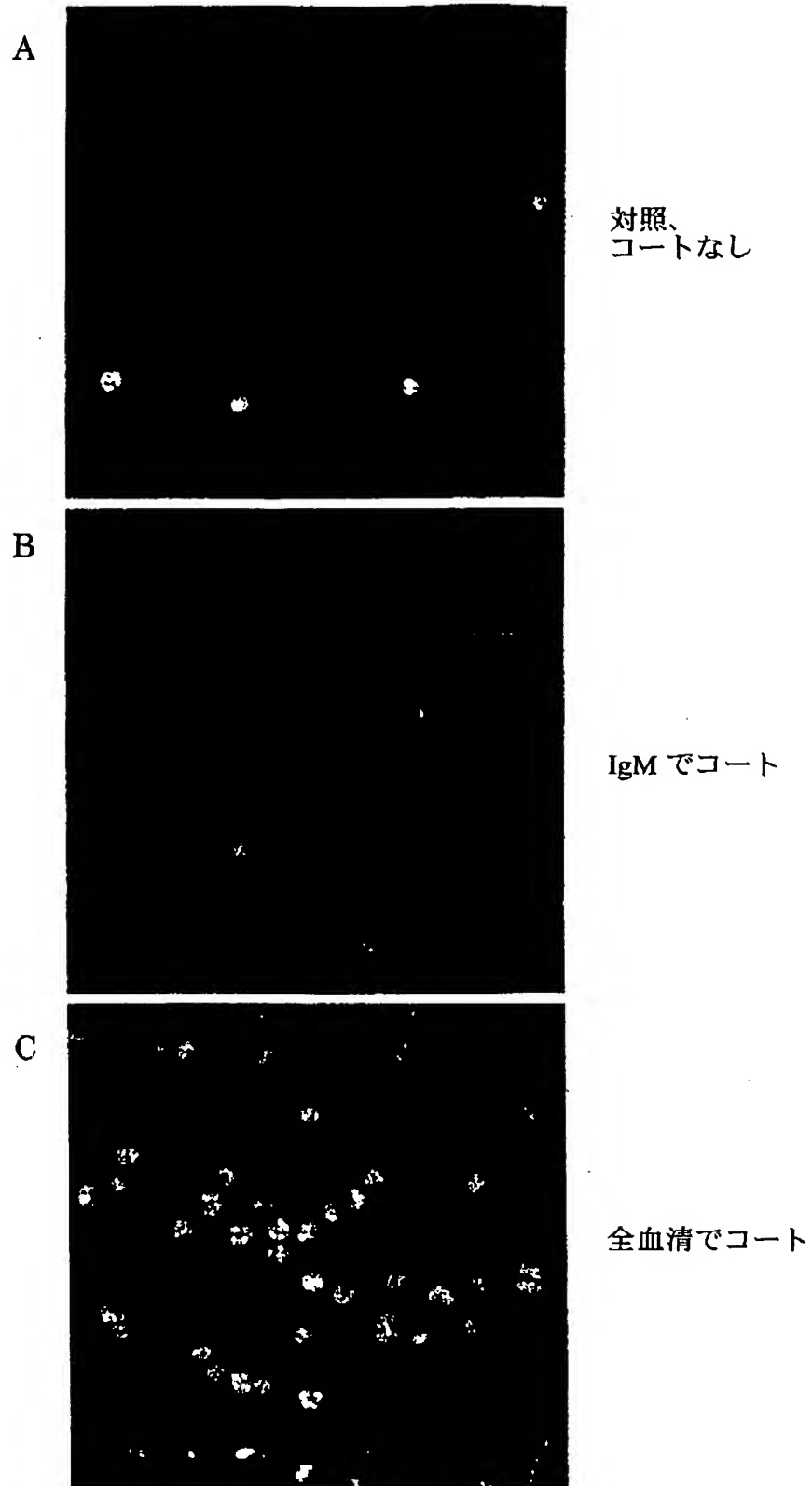
【図16】

Fig. 16



【図17】

Fig. 17



【図18】

Fig. 18

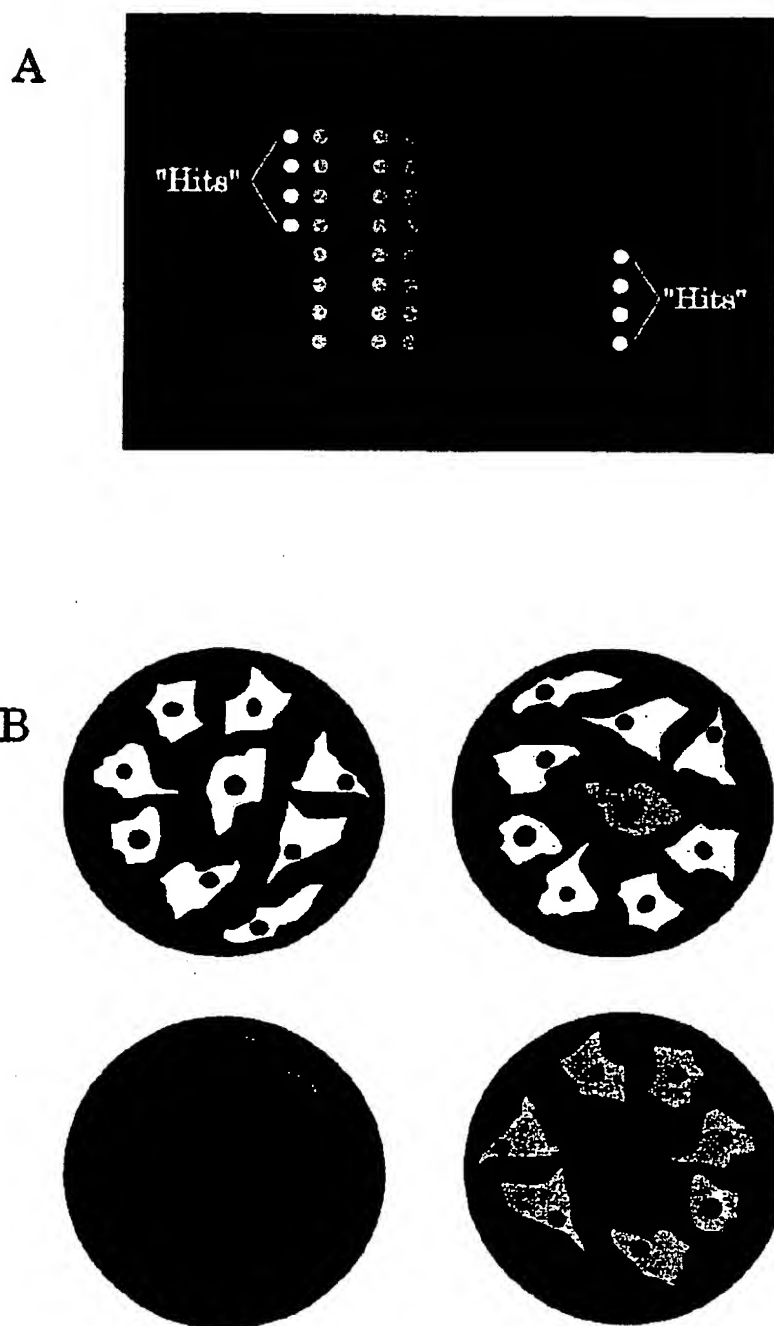
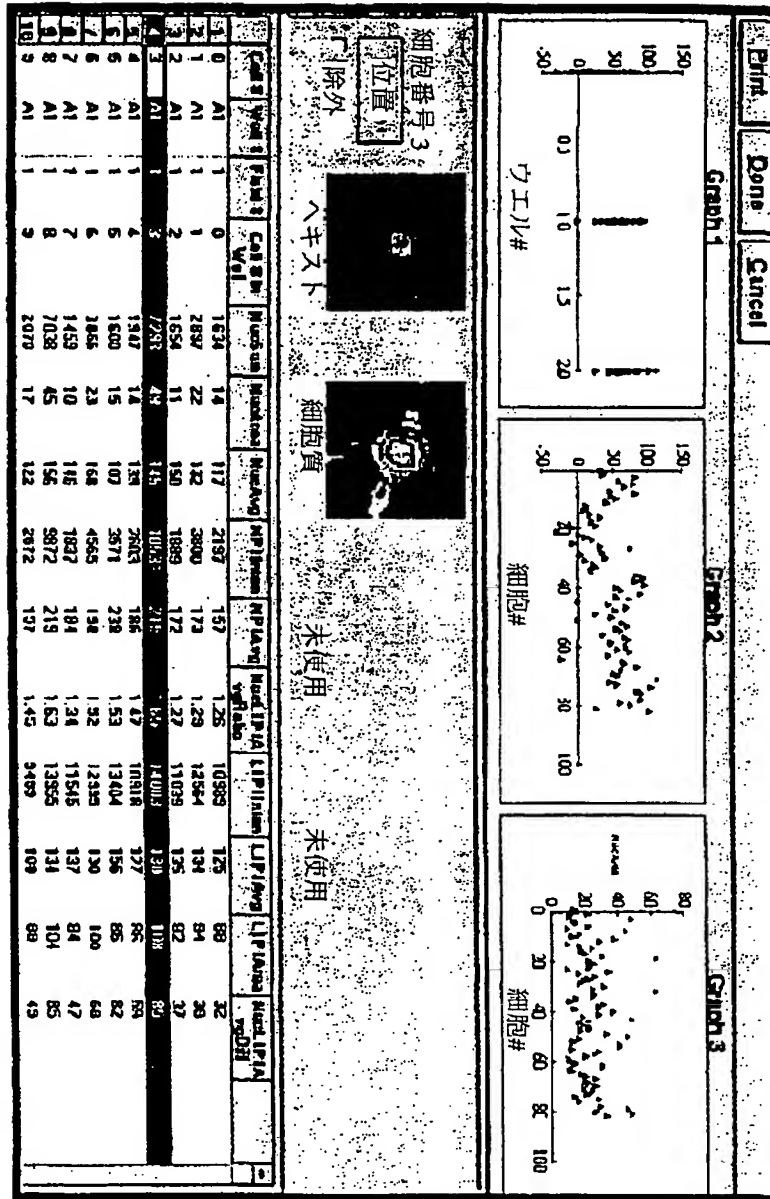


Fig. 19



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .ional Application No
PCT/US 97/09564

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/50 C12M1/34 G01N21/64		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols): IPC 6 G01N C12M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	US 5 326 691 A (HOZIER JOHN) 5 July 1994 see column 9, line 58 - column 12, line 64 see column 15, line 63 - column 18, line 36 ---	1,2,4 3 5,6
X A	US 5 324 591 A (GEORGER JR JACQUE H ET AL) 28 June 1994 see column 6, line 66 - column 9, line 45 ---	1,2,4 5,6
Y A	US 5 384 261 A (WINKLER JAMES L ET AL) 24 January 1995 see column 8, line 23 - column 11, line 35 ---	3 5,6
A	US 5 313 264 A (IVARSSON BENGT ET AL) 17 May 1994 see column 8, line 45 - column 18, line 34 --- -/--	3,5,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 October 1997		17/10/1997
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Bindon, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nat. Application No.

PCT/US 97/09564

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 673 988 A (JANSSON PETER A ET AL) 16 June 1987 see column 5, line 5 - column 6, line 15; figures see column 10, line 20 - line 26 ----	5-7
A	US 5 096 807 A (LEABACK DAVID H) 17 March 1992 see the whole document ----	5-7
A	TAYLOR D LANSING: "The new vision of light microscopy" AMERICAN SCIENTIST, vol. 80, no. 4, July 1992 - August 1992, US, pages 322-335, XP002042433 cited in the application see page 322 - page 326 -----	5-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Appl. No.

PCT/US 97/09564

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5326691 A	05-07-94	AU 3134893 A	15-06-93
		WO 9310259 A	27-05-93
		US 5563060 A	08-10-96
US 5324591 A	28-06-94	US 5077085 A	31-12-91
		US 5079600 A	07-01-92
		US 5510628 A	23-04-96
		EP 0506993 A	07-10-92
		US 5389496 A	14-02-95
		US 5500315 A	19-03-96
		US 5391463 A	21-02-95
US 5384261 A	24-01-95	AU 675054 B	23-01-97
		AU 3148193 A	15-06-93
		CA 2124087 A	27-05-93
		EP 0624059 A	17-11-94
		JP 7506561 T	20-07-95
		WO 9309668 A	27-05-93
US 5313264 A	17-05-94	SE 462408 B	18-06-90
		DE 68912343 D	24-02-94
		DE 68912343 T	05-05-94
		EP 0534941 A	07-04-93
		EP 0442921 A	28-08-91
		JP 4504765 T	20-08-92
		JP 4501462 T	12-03-92
		SE 8804075 A	10-11-88
		WO 9005295 A	17-05-90
		WO 9005317 A	17-05-90
		US 5164589 A	17-11-92
US 4673988 A	16-06-87	AU 568242 B	17-12-87
		AU 5643586 A	30-10-86
		AU 581575 B	23-02-89
		AU 8015287 A	18-02-88
		CA 1284375 A	21-05-91
		DK 181986 A	23-10-86
		EP 0199573 A	29-10-86
		JP 61248168 A	05-11-86
		US 4760385 A	26-07-88

Information on patent family members

PCT/US 97/09564

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5096807 A	17-03-92	EP 0194132 A JP 61217745 A	10-09-86 27-09-86

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.